



Universidade de Aveiro

Ano 2016/2017

Departamento de Química

**Ana Sofia
Santos Dias**

**Desenvolvimento e validação de um método
analítico para a quantificação de GHB-
GLUC e de GABA em sangue com fins
forenses**



Universidade de Aveiro

Ano 2016/2017

Departamento de Química

**Ana Sofia
Santos Dias**

**Desenvolvimento e validação de um método
analítico para a quantificação de GHB-GLUC
e de GABA em sangue com fins forenses**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Doutor André Castro, especialista superior de Medicina Legal; da Mestre Sónia Tarelho, coordenadora da UF da Delegação do Norte do SQTF-N do INMLCF,IP e do Professor Doutor Pedro Domingues, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho aos meus pais, a quem tudo devo. Não há palavras para agradecer o vosso amor e apoio incondicionais.

O júri

Presidente

Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
Professor Associado com Agregação do Departamento de
Química da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis
Marques Domingues**
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Doutor André Alexandre Lobo Lopes de Castro
Especialista Superior em Medicina Legal do Instituto Nacional
de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido ao apoio de várias pessoas, às quais quero agradecer.

Agradeço a toda a equipa do SQTF-N pela boa disposição, pela forma como me receberam e integraram ao longo do último ano.

Queria deixar um agradecimento especial aos meus orientadores, à Eng^a Sónia Tarelho e ao Doutor André Castro. Obrigada pela oportunidade e pelos inúmeros ensinamentos, a vossa exigência, empenho e disponibilidade permitiu que evoluísse e que superasse os desafios que foram surgindo ao longo deste ano.

Agradeço também ao orientador institucional, ao Professor Pedro Domingues, pela sua disponibilidade e exigência que, certamente, foram determinantes para a conclusão deste trabalho.

Obrigada à Eva, à Paula, à Sara e à Ju pela amizade ao longo destes anos.

Obrigada ao Marco, por perceberes a minha ausência e por sempre me apoiares.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais por terem sempre acreditado em mim. Obrigada pelo que são e pelo que representam para mim...

Palavras-chave Toxicologia forense; ácido γ -hidroxibutírico (GHB); GHB-glucurónico (GHB-GLUC); ácido γ -aminobutírico (GABA); espectrometria de massa; GC-MS-MS

Resumo

O ácido γ -hidroxibutírico (GHB) é um composto endógeno, sendo simultaneamente metabolito e precursor do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA). O GHB está incluído no panorama de substâncias ilícitas disponíveis com fins psicoativos. Os contextos de utilização ilícita são maioritariamente caracterizados por fins recreativos ou como substância facilitadora de crime de abuso sexual, entre outros. A curta janela de deteção do GHB levanta algumas dificuldades. Neste sentido, a recente descoberta do metabolito glucuronizado do GHB (GHB-GLUC) levantou uma possibilidade de aumento da janela de deteção do GHB. Por outro lado, o estudo do comportamento *post-mortem* do GHB e, também, do GABA, despertou o interesse a fim de contribuir para uma estimacão do intervalo *post-mortem* (PMI). Assim, é emergente a necessidade de colmatar as dificuldades referidas. Nesse sentido, são objetivos deste trabalho o estudo das vias de fragmentação dos compostos GHB-GLUC e GABA, após ionização por impacto eletrónico, em GC-MS/MS, para posterior validação de um método analítico para a quantificação simultânea do GHB-GLUC e do GABA, aliado ainda à quantificação de GHB, em amostras reais de sangue total.

Através do estudo dos mecanismos de fragmentação mais prováveis, foi possível escolher, de forma sustentada, os iões precursores e iões produto considerados mais favoráveis para posterior deteção e quantificação do GHB-GLUC e do GABA. Relativamente à validação do método para o GHB-GLUC, a metodologia extrativa escolhida foi a precipitação proteica com metanol. Para a validação do método analítico estudaram-se diversos parâmetros: a especificidade/seletividade, a linearidade, os limites de deteção e de quantificação, a precisão, a exatidão, a recuperação e a robustez do método. Relativamente ao GABA, não se obtiveram resultados reprodutíveis para este composto, tendo-se verificado, ainda, instabilidade das soluções após derivatização. A metodologia analítica desenvolvida cumpriu todos os critérios de validação exigidos, o que permitiu a aplicação da mesma a um conjunto de amostras reais: uma amostra de soro positiva para GHB e uma série de amostras de sangue periférico *post-mortem*, nas quais se conhece a data e hora do óbito e a data e hora de cada uma das duas colheitas realizadas (uma no momento da admissão do cadáver e outra na autópsia). Foi possível detetar e quantificar GHB-GLUC na amostra positiva para GHB, tendo-se verificado, pela primeira vez na literatura, uma relação entre um contexto de intoxicação por GHB e a presença de GHB-GLUC. No que diz respeito à série de amostras *post-mortem* analisadas, em nenhuma das amostras se verificou a presença de GHB-GLUC. Estes resultados permitem levantar questões relativas à real importância desta via de metabolização do GHB, nomeadamente no *post-mortem*. Quanto ao GHB, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações médias do metabolito na primeira e na segunda colheitas. Tendo-se, ainda, verificado uma correlação positiva forte ($r=0,902$) entre as concentrações de GHB *post-mortem* e o respetivo PMI na primeira colheita (ou seja, até às 10 horas de PMI).

Concluindo, este estudo forneceu dados relevantes para o potencial da análise do GHB-GLUC em casos de suspeita de consumo exógeno de GHB. Adicionalmente, os resultados obtidos neste estudo sugerem que existe uma maior correlação entre o PMI e a concentração de GHB, nas primeiras 10 horas após a morte.

Keywords

Forensic toxicology; γ -hydroxybutyrate (GHB); GHB glucuronide (GHB-GLUC); γ -aminobutyric acid (GABA); mass spectrometry; GC-MS-MS

Abstract

γ -hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous compound, simultaneously metabolite and precursor of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA). GHB is included in the panel of illicit substances available for psychoactive purposes. Its illicit use may be due to recreational purposes or drug-facilitated sexual assault, among other contexts. The short GHB detection window raises some difficulties. Thus, the recent discovery of a glucuronated GHB metabolite (GHB-GLUC), raised the possibility of increasing the window of detection of GHB. On the other hand, post-mortem behaviour of GHB and GABA has been studied to assist in PMI estimation. As so, overcome the mentioned issues is needed. The aim of this work considers the study of GHB-GLUC and GABA fragmentation pathways after electron impact ionization in GC-MS/MS, an analytical method development and validation for the simultaneous quantification of GHB-GLUC and GABA, allied to the quantification of the GHB, in order to be applied to real blood samples.

Through the study of the most probable fragmentation mechanisms, it was possible to choose, in a sustained way, the precursor and product ions considered more favourable for further detection and quantification of GHB-GLUC and GABA. Regarding the analytical method validation, as to GHB-GLUC is concerned, the chosen extractive methodology was protein precipitation with methanol. For the validation of the analytical method, several parameters were studied, including specificity/selectivity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy, recovery and ruggedness. Regarding GABA, it was not possible to perform the validation, since no reproducible results were obtained. The developed and validated analytical procedure have shown acceptable results, and allowed its application to a set of real samples, namely a serum sample positive for GHB and a series of samples of post-mortem peripheral blood in which both the date and hour of death are known, alongside the date and hour of the two sampling moments (one in the corpse admission and another at the autopsy). It was possible to detect and quantify GHB-GLUC in the GHB positive sample and, for the first time in the literature, an association between the exogenous consumption of GHB and GHB-GLUC presence was found. Regarding the series of analysed post-mortem samples, none of them shown GHB-GLUC presence. These results allow us to raise questions about the real importance of this GHB metabolism pathway, particularly in post-mortem context. Concerning to GHB, there was a statistically significant difference between the mean concentrations of the metabolite in the first and the second collection. There was also a strong positive correlation ($r=0,902$) between the post-mortem GHB concentrations and the respective PMI in the first collection (up to 10 hours of PMI).

In conclusion, this study provided relevant data to the potential of GHB-GLUC analysis in cases of suspected exogenous consumption of GHB. Furthermore, the obtained results suggest that, in the first 10 hours after death there is a higher correlation between the GHB concentration and the PMI.

Índice

Índice de Tabelas.....	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Abreviaturas	viii
1- Introdução	1
1.1- Toxicologia Forense.....	1
1.2- Ácido γ -Aminobutírico (GABA)	4
1.2.1- Determinação analítica do GABA	5
1.3- Ácido γ -Hidroxibutírico (GHB).....	9
1.3.1- Determinação analítica do GHB	13
1.3.2- Determinação analítica do GHB-GLUC e do GHB-SUL	16
1.4- Formação post-mortem de GHB e de GABA	17
1.5- Fatores que influenciam as concentrações de GHB e dos seus metabolitos	19
1.6- Validação de um método analítico.....	20
1.7- Objetivos.....	23
2- Material e Métodos	26
2.1- Reagentes, solventes e padrões analíticos.....	26
2.2- Sistema de GC-MS/MS.....	26
2.3- Desenvolvimento do método analítico.....	27
2.3.1- Procedimento extrativo	27
2.4- Preparação das amostras	28
2.5- Análise de amostras reais e análise estatística	29
3- Resultados e Discussão	31
3.1- Estudo das vias de fragmentação dos compostos em estudo após Ionização por Impacto Eletrónico em GC-MS/MS.....	31
3.1.1- Injeção em full SCAN.....	31
3.1.2- Estudo da via de fragmentação do GABA	34
3.1.3- Estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC.....	43
3.1.3.1- Estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC com o ião precursor a m/z 233.....	47
3.1.3.2- Estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC com o ião precursor a m/z 305.....	51
3.2- Validação do método analítico.....	56
3.2.1- Seleção do procedimento extrativo	57

3.2.2- Especificidade/Seletividade	58
3.2.3- Gama de trabalho, Linearidade e Modelo de Calibração	60
3.2.4- Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	65
3.2.5- Arrastamento	68
3.2.6- Rendimento da Extração	68
3.2.7- Precisão	69
3.2.8- Avaliação da Exatidão e Estimativa da Incerteza	71
3.2.9- Robustez.....	74
3.3- Quantificação de GHB-GLUC e GHB em amostras reais	75
3.3.1- Quantificação de GHB-GLUC e GHB num caso positivo para GHB	75
3.3.2- Quantificação de GHB-GLUC e GHB em amostras post-mortem	76
4- Conclusões e Perspetivas Futuras	85
4- Bibliografia	90
5- Anexos	96

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estado da arte dos métodos analíticos validados para a determinação de GABA em fluidos biológicos humanos, dos últimos 15 anos.

Tabela 2 – Estado da arte dos métodos analíticos validados para a determinação do composto GHB em amostras de sangue (sangue total, plasma ou soro), nos últimos 10 anos.

Tabela 3 – Estado da arte dos métodos analíticos validados para a determinação dos metabolitos endógenos do GHB, GHB-GLUC e do GHB-SUL.

Tabela 4 - Tempos de retenção dos compostos GABA di-TMS, GHB-GLUC sililado e GHB-GLUC-D₄ sililado, através da injeção em modo *full SCAN* de soluções-padrão de GABA, de GHB-GLUC e de GHB-GLUC-D₄ após derivatização química.

Tabela 5 – Iões produto e respectivas abundâncias relativas (%) resultantes da fragmentação CID do ião precursor, a m/z 232, com diferentes energias de colisão: 5, 10, 15 e 20 eV.

Tabela 6 – Iões produto e respectivas abundâncias relativas (%) resultantes da fragmentação CID do ião precursor, a m/z 233, com diferentes energias de colisão: 5, 10, 15 e 20 eV.

Tabela 7 – Iões produto e respectivas abundâncias relativas (%) resultantes da fragmentação CID do ião precursor, a m/z 305, com diferentes energias de colisão: 5, 10, 15 e 20 eV.

Tabela 8 – Sinais analíticos obtidos nos testes de especificidade e seletividade para amostras controlo (água) fortificadas com GHB-GLUC, nomeadamente as áreas absolutas e relativas e os tempos de retenção. Apresenta-se conforme se a área e o tempo de retenção relativos se encontram no intervalo de tolerância, ou seja, 21,1-31,7% e 1,1540-1,571, respetivamente.

Tabela 9 – Resultados obtidos no estudo da homocedasticidade das variâncias para o GHB-GLUC, bem como a respetiva média, desvio-padrão, variância e coeficiente de variação em valor percentual.

Tabela 10 - Resultados do Estudo de Regressão para a Linearidade do GHB-GLUC, nomeadamente o teste estatístico F.

Tabela 11 – Resultados do estudo da aplicação de fatores de ponderação para o GHB-GLUC, com base em diferentes curvas de calibração.

Tabela 12 – Dados obtidos no estudo do limite de repetibilidade em cada um dos três níveis de controlo de qualidade, nos diferentes fatores de ponderação em estudo; bem como a classificação (*rank*) atribuída a cada um dos fatores.

Tabela 13 – Dados obtidos no estudo da incerteza expandida em cada um dos três níveis de controlo de qualidade, nos diferentes fatores de ponderação em estudo, bem como a classificação (*rank*) atribuída a cada um dos fatores.

Tabela 14 – *Ranking* final dos diferentes fatores de ponderação com base na soma das classificações (*rank*) em cada um dos parâmetros em estudo, o limite de repetibilidade, a incerteza expandida e erro relativo.

Tabela 15 – Dados da curva de calibração, tais como o declive, o desvio padrão residual, o coeficiente de correlação (*r*) e o coeficiente de correlação de Pearson (r^2). Estão ainda representados os limites de deteção e de quantificação calculados.

Tabela 16 – Dados da concentração de GHB-GLUC calculada em ng/mL para cada uma das réplicas, bem como o respetivo coeficiente de variação (%) calculado.

Tabela 17 – Resultados obtidos para o rendimento da extração em cada um dos níveis, a média por nível e, ainda, o rendimento médio de extração, em valor percentual.

Tabela 18 – Resultados obtidos para os parâmetros repetibilidade (S_r), precisão entre grupos (S_{run}), precisão intermédia (S_1) coeficiente de variação (CV) e limite de repetibilidade (*r*), para cada um de três níveis de concentração de GHB-GLUC.

Tabela 19 – Resultados da recuperação média (\bar{R}_m) e da incerteza associada à exatidão ($u(\bar{R}_m)$), para cada um dos níveis de concentração, a 1000 ng/mL, 2500 ng/mL e a 4000 ng/mL de GHB-GLUC.

Tabela 20 – Resultados do teste *t-student* para a incerteza-padrão associada à exatidão dos resultados.

Tabela 21 – Resultados obtidos da incerteza-padrão relativa, $u'(\bar{R}_m)$ da incerteza-padrão combinada, $u(y)$, e da incerteza expandida combinada, $U(y)$, para cada um dos níveis de concentração.

Tabela 22 – Dados do conjunto de processos estudados, a idade e o género do indivíduo, assim como o intervalo *post-mortem*, em horas, da primeira e da segunda colheitas.

Tabela 23 – Resultados da concentração de GHB (mg/L) na primeira e segunda colheita, a concentração apresentada em cada caso é resultante da média de concentrações obtidas em ambas as réplicas. Estão também apresentados os intervalos, em horas, desde a morte até à colheita da amostra, ou seja, o intervalo *post-mortem* (PMI).

Índice de Figuras

Figura 1 - Biossíntese e metabolismo do GHB e do GABA, assim como a sua formação a partir dos precursores GBL e 1,4-BD. Representada ainda a via de eliminação de GHB (Adaptada de (12,13)).

Figura 2 - Estrutura química dos compostos: a) ácido γ -hidroxibutírico (GHB); b) ácido γ -aminobutírico (GABA); c) γ -butirolactona (GBL) e d) 1,4-butanediol (1,4-BD) (Adaptado de (12)).

Figura 3 - Estrutura química dos metabolitos do GHB: a) GHB-glucurónido (GHB-GLUC); b) GHB sulfónico (GHB-SUL) (Adaptada de (49)).

Figura 4 - Produtos da reação completa de derivatização com o reagente de derivatização BSTFA:1%TMCS do GABA (Fig. 4a), do GHB-GLUC (Fig. 4b) e do GHB-GLUC-D₄ (Fig. 4c).

Figura 5 – a) Espetro de massa GC/EI-MS em modo full SCAN na gama m/z (50→500) do GABA sililado, sendo o íon molecular do GABA di-TMS, a m/z 247. b) e c) Espetros de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→660) do GHB-GLUC sililado (Fig. 5b) e do GHB-GLUC-D₄ sililado (Fig. 5c).

Figura 6 – Proposta do processo geral de fragmentação do GABA di-TMS partindo do íon molecular a m/z 247. Encontra-se representado em a) o íon precursor selecionado (m/z 232), em b) o íon produto de quantificação (m/z 216) e em c) o íon produto diagnóstico (m/z 147).

Figura 7 – Espetro de massa GC/EI-MS em modo full SCAN na gama m/z (50→500) do GABA di-TMS e proposta de respetivas estruturas químicas dos fragmentos.

Figura 8 - Proposta de mecanismos de fragmentação para formação do íon fragmento a m/z 232, a partir do íon molecular a m/z 247.

Figura 9 - Proposta de mecanismos de fragmentação para formação dos íões fragmento a m/z 142, a (Fig. 9a); assim como dos íões fragmento a m/z 147 (Fig. 9b) e a m/z 103 (Fig. 9c), a partir da fragmentação do íon precursor a m/z 232.

Figura 10 – Proposta de mecanismos de fragmentação para formação dos íões fragmento: m/z 218 (Fig. 10a) e a m/z 102 (Fig. 10b), a partir do íon molecular (m/z 247).

Figura 11 – Espetro de massa GC-EI/MS/MS do íon precursor, a m/z 232, do GABA di-TMS e respetiva representação das estruturas químicas propostas para os produtos de fragmentação por CID, a 10 eV.

Figura 12 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a formação do íon produto, a m/z 216, a partir da fragmentação CID do íon precursor, a m/z 232.

Figura 13 – Proposta do processo geral de fragmentação do GHB-GLUC, partindo do íon molecular a m/z 496. Encontra-se representado em a) o íon precursor selecionado a m/z 233 (correspondente ao íon precursor a m/z 237 do análogo deuterado, GHB-GLUC-D₄), em b) o íon de quantificação (m/z 147) e em c) os possíveis íons diagnóstico (m/z 143 e m/z 145). Em a)* encontra-se representado o íon precursor selecionado, a m/z 305 (na impossibilidade de se recorrer ao GHB-GLUC-D₄ como padrão interno), em b)* o íon de quantificação (m/z 143) e em c)* os possíveis íons diagnóstico (m/z 147 e m/z 149).

Figura 14 – Espectro de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→660) do derivado sililado do GHB-GLUC com as estruturas químicas propostas dos fragmentos representados.

Figura 15 – Espectro de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→660) do derivado sililado do GHB-GLUC-D₄ com as estruturas químicas propostas dos fragmentos representados.

Figura 16 – Proposta de vias de fragmentação para a formação dos íons fragmento a m/z 159 (Fig. 16a) e a m/z 305 (Fig. 16b), a partir da fragmentação EI do íon molecular do GHB-GLUC tri-TMS, a m/z 496.

Figura 17 – Proposta de vias de fragmentação para a formação dos íons fragmento comuns aos espectros de massa do GHB-GLUC e do GHB-GLUC-D₄, a m/z 305 (Fig. 17a), a m/z 233 (Fig. 17b) e a m/z 217 (Fig. 17b), a partir da fragmentação EI do íon molecular do GHB-GLUC tri-TMS, a m/z 496.

Figura 18 – Espectro de massa GC-EI/MS/MS do íon precursor a m/z 233, no caso do GHB-GLUC (Fig. 18a) e do íon precursor a m/z 237, no caso do GHB-GLUC-D₄ (Fig. 18b), e as respetivas representações das estruturas químicas propostas para os produtos de fragmentação por CID, a 10 eV.

Figura 19 – Proposta de vias de fragmentação para a formação dos íons produto, a m/z 147 (Fig. 19a), a m/z 145 (Fig. 19b) e a m/z 143 (Fig. 19c), a partir da fragmentação CID do íon precursor do GHB-GLUC, a m/z 233.

Figura 20 - Espetro de massa GC-EI/MS/MS do ião precursor a m/z 305, do GHB-GLUC, bem como as respetivas representações das estruturas químicas propostas para os produtos de fragmentação por CID, a 20 eV.

Figura 21 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a formação dos iões produto, a m/z 147 (Fig. 21a) e a m/z 149 (Fig. 21b), a partir da fragmentação CID do ião precursor do GHB-GLUC, a m/z 305.

Figura 22 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a formação do ião produto, a m/z 143, a partir da fragmentação CID do ião precursor do GHB-GLUC, a m/z 305.

Figura 23 – Espetro GC- EI/MS/MS da transição $305 \rightarrow 143$ do GHB-GLUC, numa amostra de controlo de sangue fortificado, após extração LLE com acetato de etilo.

Figura 24 – Curva de calibração obtida para o cálculo dos limites de deteção e de quantificação para o GHB-GLUC, aplicando regressão linear normal.

Figura 25 – Comparação das concentrações médias de GHB (ng/mL) entre géneros na primeira colheita e segunda colheitas. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio-padrão (Mann-Whitney test).

Figura 26 - Comparação entre as concentrações médias de GHB (ng/mL) dos indivíduos com idade inferior a 50 anos e os indivíduos com idade superior a 50 anos, na primeira e segunda colheita. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio-padrão (t-test não emparelhado).

Figura 27 – Comparação entre a concentração média de GHB (ng/mL) na primeira colheita realizada e a concentração média do mesmo analito na segunda colheita. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio-padrão das nove amostras em estudo (n=9). *** $P < 0.001$ vs 1ª Colheita (t-test emparelhado).

Figura 28 – Relação entre a concentração endógena de GHB no sangue periférico (ng/mL) e o intervalo *post-mortem* (horas), dos resultados obtidos na primeira colheita. Os resultados apresentados são a média das duas réplicas realizadas.

Figura 29 – Relação entre a concentração endógena de GHB no sangue periférico (ng/mL) e o intervalo *post-mortem* (horas), dos resultados obtidos na segunda colheita. Os resultados apresentados são a média das duas réplicas realizadas.

Figura 30 – Relação entre a variação de concentrações endógenas de GHB no sangue periférico relativas (%) e a variação entre os intervalos *post-mortem* (horas), variação esta entre a segunda colheita e a primeira colheita.

Índice de Abreviaturas

1,4-BD: 1,4-Butanediol

ACN: Acetonitrilo

CE: Eletroforese Capilar

CID: Dissociação Induzida por Colisão

CQ: Controlo de Qualidade

DOPA: Dopamina

EI: Impacto Eletrónico

ESI: Eletrospray

FDA: *Food and Drug Administration*

FLD: Detecção por Fluorescência

GABA: Ácido γ -Aminobutírico

GAD: Ácido Glutâmico Descarboxilase

GBL: γ -Butirolactona

GC-MS/MS: Cromatografia gasosa com espectrometria de massa em *tandem*

GC-MS: Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrómetro de Massa

GHB: Ácido γ -Hidroxibutírico

GHB-GLUC: GHB-Glucurónido

GHB-SUL: GHB-sulfónico

INMLCF: Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

LC: Cromatografia Líquida

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LIF: Fluorescência induzida por laser

LLE: Extração Líquido-Líquido

LOD: Limite de deteção

LOQ: Limite de Quantificação

MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina

MRM: Monitorização de reações múltiplas

NBD-F: 4-fluoro-7-nitrobenzenofurano

OPA: Ortoftaldeído

PI: Padrão Interno

PMI: Intervalo post-mortem

SNC: Sistema Nervoso Central

SPE: Extração em Fase Sólida

SQTF: Serviço de Química e Toxicologia Forenses

SQTF-N: Unidade Funcional do Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Norte

SSA: Semialdeído Succínico

SSADHD: Deficiência da Semialdeído Succínico Desidrogenase

TMS: Trimetilsilano

TOF: Tempo de Voo

TR: Tempo de Retenção

1– Introdução

1- Introdução

1.1- Toxicologia Forense

A toxicologia é uma ciência de caráter multidisciplinar, assentando numa base de conhecimento patológico, bioquímico, químico e fisiológico, assim como na própria observação experimental (1). Esta ciência compreende o estudo dos compostos tóxicos, incluindo as suas propriedades físico-químicas, os seus mecanismos de ação e os seus efeitos. Inclui ainda o estudo das intoxicações, caracterizando o seu surgimento e o contexto das mesmas, pretendendo estabelecer limites de segurança para a interação entre os sistemas biológicos e a exposição a determinado agente tóxico (1,2). Para a análise de compostos tóxicos em materiais biológicos e não biológicos, esta ciência engloba, ainda, o desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos (2). Note-se que qualquer substância, incluindo substâncias essenciais para os organismos, pode ser potencialmente lesiva para o equilíbrio biológico, alterando os elementos bioquímicos fundamentais à vida e poderá, conseqüentemente, ser considerada uma substância tóxica (1). O conjunto de efeitos adversos resultantes da exposição de um organismo a uma substância tóxica define, assim, uma intoxicação (3).

A toxicologia moderna contempla diversas disciplinas, entre as quais a toxicologia clínica, a forense, a reguladora e a de investigação, estando todas estas interrelacionadas (4). A toxicologia forense consiste na aplicação dos conceitos da toxicologia a situações que visam a resolução de um quesito médico-legal, no sentido de auxiliar no esclarecimento de questões judiciais, averiguando se determinado agente tóxico foi responsável ou teve influência num determinado desfecho, seja este um crime, um acidente ou um ato no estado de influenciado passível de consequências penais (5).

O amplo campo de ação desta ciência forense abrange o estudo do indivíduo vivo e do cadáver, podendo incluir, ainda, questões do âmbito laboral ou ambiental. Os exames no indivíduo vivo visam a correlação entre a ingestão de determinada(s) substância(s) tóxica(s) por um indivíduo e determinadas ações realizadas pelo mesmo, que podem incluir, por exemplo, condução sob o efeito de drogas ou álcool, cometer um crime no estado de influenciado ou ser vítima de abuso sexual (5,6). Assim, e a título de exemplo, estes exames podem ter como objetivo a fiscalização do consumo de substâncias psicoativas nos utilizadores da via pública, o que implica a realização, por parte do Instituto Nacional de

Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), de exames de quantificação de álcool etílico no sangue, assim como o rastreio, confirmação da presença ou ausência e quantificação de substâncias consideradas legalmente estupefacientes e psicotrópicas no sangue, de acordo com a Portaria nº 902-A/2007 de 13 de Agosto de 2007 e com a Portaria nº 302-B/2007 de 13 de Agosto de 2007 (7).

Sobre o cadáver poderão ser requisitadas perícias toxicológicas no caso de suspeita de morte por intoxicação, a qual é considerada, ao abrigo do Código Penal Português, morte violenta, com consequente obrigatoriedade de se proceder à realização de autópsia médico-legal (nos termos do Decreto-Lei 166/2012, de 31 de Julho) (8). No caso de uma autópsia ser realizada num espaço de tempo relativamente curto após a morte e caso o corpo não tenha sido exposto a condições ambientais severas, os resultados dos testes de toxicologia poderão identificar a(s) substância(s) tóxica(s) que estariam presentes no corpo no momento da morte. A quantificação desta(s) substância(s) pode auxiliar no esclarecimento da causa de morte, nomeadamente em casos de *overdose* (5,6).

Em termos analíticos, a determinação toxicológica é constituída por diferentes etapas sequenciais: rastreio analítico e a deteção, no qual se descartam os resultados negativos; a identificação e a confirmação, cuja finalidade é verificar a presença da substância tóxica na amostra; e a quantificação. Todos estes passos podem ser precedidos de uma extração, na qual se pretende isolar a(s) substância(s) tóxica(s) da amostra (1). É ainda de ressaltar que o rigor analítico exigido na toxicologia forense deve fazer jus à importância desta ciência ao nível da aplicação da justiça, sendo uma preocupação recorrente ao longo destas etapas o cumprimento da cadeia de custódia desde que a amostra chega ao laboratório, com a criação de mecanismos que garantam que a amostra em estudo pertence ao indivíduo a analisar sem ter sofrido qualquer adulteração (4).

Como em qualquer ciência analítica, os resultados obtidos após as etapas referidas anteriormente carecem de uma meticulosa interpretação. Em compostos que são também produzidos de forma endógena, a dificuldade de interpretação dos resultados analíticos torna-se acrescida. É necessário, ainda, ter em conta a eventual incapacidade de um determinado laboratório na deteção do agente etiológico da intoxicação, devido à adoção de um método de extração não adequado, a perdas excessivas do produto e/ou à utilização de técnicas de deteção pouco sensíveis (1). Enfoca-se, ainda, a dificuldade de estabelecer

limites entre os níveis considerados terapêuticos e os níveis tóxicos de uma dada substância. Os intervalos de referência citados na literatura geralmente não são mais do que uma mera orientação devido, por exemplo, à falta de suporte estatístico, uma vez que a maioria dos estudos é realizada com amostra reduzida (3). Outros fatores importantes são a variabilidade individual na resposta a um tóxico, podendo advir de diferentes contextos, entre os quais a suscetibilidade genética (ex. devido a polimorfismos genéticos) e as reações idiossincráticas, em que ocorre uma hipersensibilidade a níveis reduzidos de um composto químico ou uma extrema insensibilidade a elevados níveis do mesmo. A interação com outros químicos poderá também ser um fator importante, uma vez que, por sinergia, potenciação ou antagonismo, pode surgir uma alteração da resposta normal do indivíduo à dose normal de cada um dos químicos (9).

A lista de substâncias com interesse forense é abrangente e muito eclética. Inclui grupos variados, quer ao nível da estrutura e da origem, quer ao nível do seu mecanismo de ação e efeitos sobre o organismo. O ácido γ -aminobutírico (GABA) e o ácido γ -hidroxibutírico (GHB) encontram-se nessa lista, sendo a sua deteção utilizada para interpretação de contextos diversos, no âmbito forense, conforme se descreverá a seguir.

1.2- Ácido γ -Aminobutírico (GABA)

O GABA, o principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC) humano, está amplamente distribuído pelo cérebro, sendo encontrado em cerca de 30 a 40% das sinapses (10,11). Conforme ilustrado na **figura 1**, o GABA é sintetizado nos terminais GABAérgicos através da descarboxilação do principal neurotransmissor excitatório do SNC, o glutamato, pela enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD, do inglês *Glutamic Acid Decarboxylase*) (12,13). O GABA, pela ação da GABA aminotransferase, dá origem ao semialdeído succínico (SSA, do inglês *succinic semialdehyde*) (12). A maioria do SSA é convertida em ácido succínico e incorporada no ciclo dos ácidos tricarboxílicos; no entanto, outra pequena porção (menos de 2%) é, por meio de uma oxidação, convertida em ácido γ -hidroxibutírico (GHB) pela SSA redutase (14). O restante metabolismo e via de eliminação do GHB, representado na **figura 1**, está descrito na secção seguinte. É, ainda, de salientar que o GHB pode ser considerado, simultaneamente, metabolito e precursor do neurotransmissor GABA.

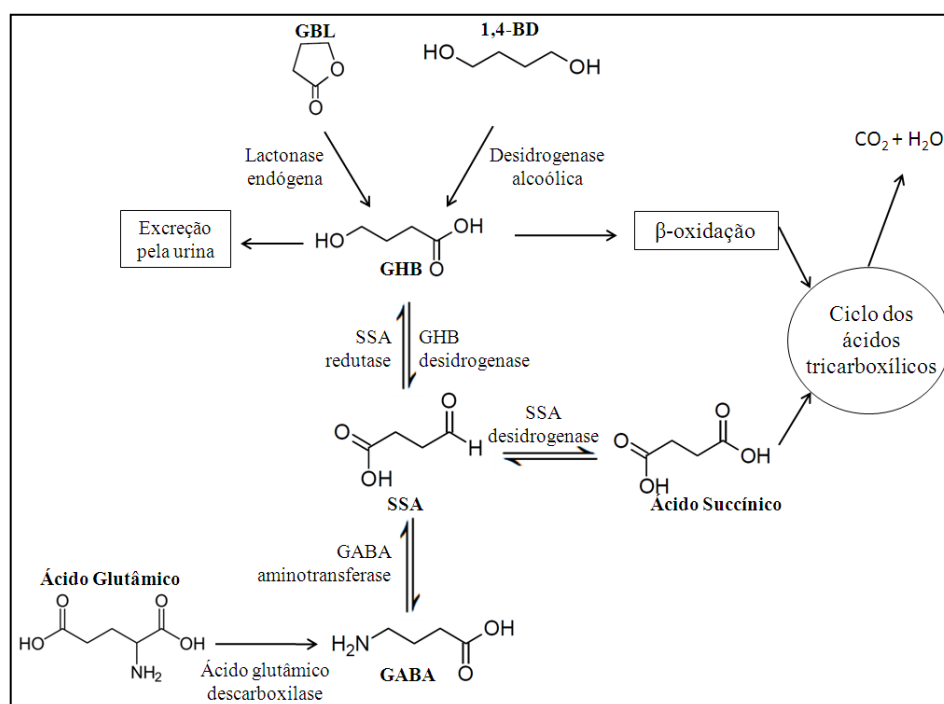


Figura 1 - Biossíntese e metabolismo do GHB e do GABA, assim como a sua formação a partir dos precursores GBL e 1,4-BD. Representada ainda a via de eliminação de GHB (Adaptada de (12,13)).

Após ser libertado nas sinapses, o neurotransmissor referido é inativado pelo *reuptake* para os terminais pré-sinápticos ou para células da glia, mediadas pelos transportadores de GABA. Existem dois tipos principais de recetores GABAérgicos: os recetores GABA_A, recetores estes ionotrópicos e maioritariamente pós-sinápticos, e os recetores GABA_B, recetores metabotrópicos maioritariamente nos terminais pré-sinápticos. Consequentemente, os recetores GABA_A medeiam o potencial pós-sináptico inibitório rapidamente, enquanto os recetores GABA_B medeiam este mesmo potencial de forma lenta (15,16).

A ligação aos recetores GABA_A tem funções fisiológicas importantes, tais como o controlo da excitabilidade cerebral, do sistema circadiano e interferência nos sistemas cognitivo, de memória e de aprendizagem (16). O sistema GABAérgico é também alvo terapêutico associado a diversas condições patológicas. Neste sentido, as propriedades da classe de fármacos das benzodiazepinas, englobando sedativos, ansiolíticos e relaxantes musculares, estão associadas a ligações específicas a recetores GABA_A. Quanto aos recetores GABA_B, pensa-se que a sobre-regulação da sua expressão está relacionada com a inflamação (15). Esta relação entre o sistema GABAérgico e a inflamação está revista em Crowley *et al.* (15), sendo que a inflamação induz alterações nos sistemas de neurotransmissão GABAérgicos, nomeadamente uma diminuição da densidade de neurónios GABAérgicos no SNC causada por estímulos inflamatórios. Assim, o sistema GABA é considerado um potencial alvo terapêutico para a modulação central da inflamação (15).

1.2.1- Determinação analítica do GABA

Dadas as funções fisiológicas do GABA acima revistas, o seu estudo e a sua quantificação têm sido realizados na investigação de diversas condições neurológicas. Verificaram-se níveis elevados de GABA em líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com doença de Alzheimer (17), assim como em plasma de crianças diagnosticadas com autismo (18). Segundo Dhossche *et al.* (18), uma possibilidade justificativa para os elevados níveis plasmáticos de GABA passa pela hipossensibilidade de um subconjunto de recetores GABA, com consequente aumento compensatório da libertação pré-sináptica do neurotransmissor. Neste sentido, seria expectável, ainda, uma maior ativação pós-sináptica de outros recetores GABA, resultando em alterações complexas da função GABAérgica (18). Por outro lado, verificaram-se baixos níveis de GABA no LCR de pacientes com depressão

(19), bem como em plasma de pacientes com doença bipolar e outros transtornos mentais (20).

Na **tabela 1** encontram-se sintetizados os métodos analíticos validados para a determinação de GABA em fluidos biológicos humanos, nos últimos 15 anos. Vários foram os fluidos humanos estudados, nomeadamente a urina, o LCR, o plasma e o soro. Num procedimento analítico, um dos passos fulcrais é a extração das substâncias que se pretendem estudar a partir dos diferentes tipos de matriz biológica. O processo de extração visa a eliminação de interferentes originários da matriz da amostra em estudo, assim como concentrar e estabilizar as substâncias a estudar, de forma a otimizar a preparação da amostra para a análise instrumental. Neste sentido, é de salientar que, sem a escolha do método de extração mais adequado e eficiente, todo o procedimento perde a sua credibilidade (21).

Assim, o GABA pode ser extraído de matrizes biológicas utilizando diferentes técnicas de extração, das quais se destacam a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) (22). Na LLE ocorre partição da amostra em duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), sendo que a eficiência do processo depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações realizadas. O composto é extraído utilizando um solvente orgânico (23). Na SPE, o analito liga-se a uma fase sólida, também designado sólido adsorvente. Existem, de acordo com o sólido adsorvente adotado, e também da sua interação com o analito, diferentes tipos de separação, tais como a SPE em fase reversa, a SPE de fase normal e a SPE de troca iónica (23).

A SPE tem inúmeras vantagens comparativamente à LLE, entre as quais a sua elevada sensibilidade, a maior reprodutibilidade, o facto de evitar a formação de emulsões e permitir obter extratos mais limpos, sendo que o extrato final será tanto mais limpo quanto mais específica for a interação entre o analito e o adsorvente. No entanto, com base na literatura consultada, a LLE é a técnica extrativa mais utilizada para o analito em estudo, o GABA (24–26) Esta tendência pode ser justificada pela sua maior simplicidade e aplicabilidade, assim como pelo baixo custo associado ao método de LLE (27).

Tabela 1 – Estado da arte dos métodos analíticos validados para a determinação de GABA em fluidos biológicos humanos, dos últimos 15 anos.

Ano	Ref.	Amostra	Extração	Derivatização	Técnica Analítica	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Gama de Trabalho (ng/mL)	Recuperação
2004	(28)	Urina; LCR	-	Sim	SAI-HPLC	1,0	-	100 - 2 000	96 - 103%
2005	(17)	Plasma	-	Sim	LC-MS/MS	5,0	-	10 - 250	20,10%
		LCR	-			-	-	-	57,70%
2008	(29)	LCR	-	Não	LC-MS/MS	-	7,8	7,8 - 2 000	-
2010	(24)	Plasma	LLE	Sim	LC-MS/MS	-	0,2	20,6 - 6 002	102%
2013	(30)	Soro	SPE	Sim	CE-LIF	0,003	-	0,04 - 4,12	97,30%
2014	(31)	Microdialisato	-	Não	LC-MS/MS	-	20	20 - 2 000	73 - 89%
2014	(32)	LCR	-	Sim	CE-LIF	0,1	-	0,26 - 103	-
2016	(33)	CSF; Plasma	-	Sim	LC-FLD	0,5	1,03	-	-
2017	(25)	Plasma	LLE	Não	LC-MS/MS	300	1000	1000 - 500 000	88,80%
		Urina				200	500	500 - 500 000	81,50%
		LCR				200	500	500 - 500 000	90%
2017	(26)	Plasma	LLE	Sim	LC-MS/MS	-	-	0,0500 - 5,00	91 - 121%

“-” – Não Divulgado; LLE – Extração Líquido-Líquido; SPE – Extração em Fase Sólida; LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação

Relativamente à técnica analítica utilizada, na **tabela 1** é possível verificar que as técnicas mais utilizadas para a determinação e quantificação de GABA foram a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e a eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*). É possível ainda verificar que têm vindo a ser utilizados vários métodos de deteção, como a deteção por fluorescência (FLD, do inglês *Fluorescence Detection*) (33); a deteção de fluorescência induzida por laser (LIF, do inglês *Laser-Induced Fluorescence*) (30,32) e, também, a deteção por espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (25,26,28,31,32), tendo sido o último o método de deteção mais utilizado. A MS é reportada como tendo uma boa seletividade e especificidade, uma vez que os analitos são identificados pela massa molecular e respetivo padrão de fragmentação, sendo, ainda, baseada em vias de dissociação específicas para o analito em questão (24).

Verifica-se, também, que na maioria dos métodos analíticos apresentados na **tabela 1** se procede à derivatização, com diversos reagentes de derivatização, entre os quais o 4—fluoro-7-nitrobenzenofurano (NBD-F) (17,32), o cloreto de dansilo (24) e o ortoftaldeído (OPA) (28,33). Este passo é importante nos métodos de detecção LIF e FLD, uma vez que os aminoácidos, o GABA inclusive, não apresentam fluorescência intrínseca, sendo necessário proceder à derivatização química do composto para que este possa ser detetado (30,32). Quanto à detecção por MS, neste método, principalmente na região de baixa razão massa/carga (m/z), existem picos de interferência que podem diminuir a sensibilidade e a especificidade. Como a derivatização aumenta a massa molecular do composto, este procedimento é considerado relevante para o estudo de neurotransmissores e dos seus metabolitos (24).

Na **tabela 1** encontram-se representados, para cada método e sempre que disponibilizados na literatura, os valores obtidos para diferentes parâmetros de validação anteriormente referidos, como os limites de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e de quantificação (LOQ, do inglês *Lower Limit of Quantification*); a gama de trabalho estipulada e os valores de recuperação (%) obtidos. Pela análise destes mesmos parâmetros, é possível verificar que os menores valores de LOD são obtidos nos métodos com detecção LIF (30,32). No entanto, também são estes métodos que apresentam uma gama de trabalho menos ampla, o que poderá ser limitativo.

Dada a importância acima referida do GABA em diversos processos biológicos e em condições neurológicas, a quantificação do mesmo, em fluidos biológicos, tem sido realizada, maioritariamente, para monitorizar do tratamento efetuado para diversas patologias (24,32,33), assim como para o estudo de biomarcadores para o desenvolvimento de medicamentos (26,28–30). Assim, da literatura consultada, apresentada na **tabela 1**, apenas no estudo realizado por Busardo *et al.* (25) procedem à determinação analítica de GABA também para fins forenses. No estudo citado, os autores concluem que a quantificação do GABA em amostras biológicas não fornece informações adicionais relativamente ao consumo de GHB. No entanto, também concluem que seria importante a validação de um método analítico com menores valores de LOQ (25).

1.3- Ácido γ -Hidroxibutírico (GHB)

O ácido γ -hidroxibutírico (GHB), um ácido gordo de cadeia curta (**Fig.2a**), é um composto endógeno presente no SNC e nos tecidos periféricos dos mamíferos. O GHB foi inicialmente sintetizado e estudado por Laborit em 1960, no sentido de encontrar um análogo do neurotransmissor GABA (**Fig.2b**), mas com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica para possíveis efeitos terapêuticos (22). Com efeito, o GHB atua como depressor do SNC, tendo uma ação hipnótica e sedativa comparável à dos barbitúricos e das benzodiazepinas. Na literatura, tal como revisto por Nicholson *et al.* (14), são referidos aspetos farmacológicos únicos deste composto, funcionando como neurotransmissor e neuromodulador diferenciado (14).

O GHB tem mais de 30 anos de história de utilização na medicina, tanto na Europa como nos Estados Unidos, onde era também vendido como suplemento dietético para culturistas, devido ao facto deste composto promover a estimulação de hormona de crescimento, com consequente crescimento muscular (34). Começou por ser utilizado como anestésico, apesar de, posteriormente, esta utilização terapêutica ter sido abandonada, dado ter-se verificado que os seus efeitos adversos são superiores aos efeitos terapêuticos (22). Mais recentemente, nos EUA, a *Food and Drug Administration* (FDA) concedeu estatuto de medicamento órfão à formulação terapêutica do GHB, designada oxibato de sódio (Xyrem®), como substância controlada, com distribuição restrita, para tratamento da narcolepsia com cataplexia (35). Têm ainda sido descritas diversas aplicações terapêuticas deste composto, tais como o tratamento das síndromes da abstinência alcoólica e de opiáceos, bem como da fibromialgia (36,37). Está ainda em estudo a utilização de GHB em humanos, como possível terapêutica para a prevenção ou retardamento do desenvolvimento da doença de Alzheimer, entre outros (38,39).

Relativamente à utilização ilícita de GHB, esta compreende o seu uso para fins recreativos devido às sensações de bem-estar e de relaxamento reportadas pelos consumidores. O GHB, também designado por «ecstasy líquida», funciona como indutor do sono após eventos festivos, tais como as *rave parties*, onde é frequente o consumo de estimulantes. É ainda frequente o consumo de GHB em associação com outras substâncias, tais como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), conhecida como «ecstasy», a cocaína, metanfetaminas e o etanol. Devido ao efeito sinérgico, a combinação de GHB e

etanol é especialmente perigosa sendo, ainda assim, a associação mais frequente (14,22,40,41).

O GHB é incolor, inodoro, bastante solúvel e ligeiramente salgado. Estas características tornam a sua mistura em bebidas praticamente impercetível. Dependendo da dose, o GHB pode interferir com o controlo motor e da fala, induzindo um estado de sedação profunda. Os efeitos do composto surgem 15 a 30 minutos após a ingestão e prolongam-se até cerca de 6 horas, sendo rapidamente eliminados, tornando difícil a sua deteção ao fim de 12 horas (22,42,43). Todos estes fatores referidos fundamentam a utilização de GHB como droga facilitadora de crimes de abuso sexual. Acresce ainda o facto de os efeitos amnésicos causados pelo GHB possivelmente conduzirem a que exista um menor número de casos de abuso sexual reportados do que os que na realidade poderão ter ocorrido. Apesar do GHB ser comumente descrito como a droga da violação, neste caso mais associado ao consumo involuntário do composto, a maioria das vezes, pelos motivos já descritos, as pessoas tomam este composto de forma voluntária (22).

O composto GHB está, desde 2001, incluído no anexo IV da Convenção das Nações Unidas para as Substâncias Psicotrópicas, tornando-se obrigatório para os países signatários, incluindo Portugal, o controlo da substância. No entanto, a proibição da sua venda não impediu a sua venda ilícita, nomeadamente na internet (44). Ainda de referir que a venda dos seus precursores γ -butirolactona (GBL) (**Fig. 2c**) e 1,4-butanediol (1,4-BD) (**Fig. 2d**) que, uma vez no corpo rapidamente se transformam em GHB, é legal (45).

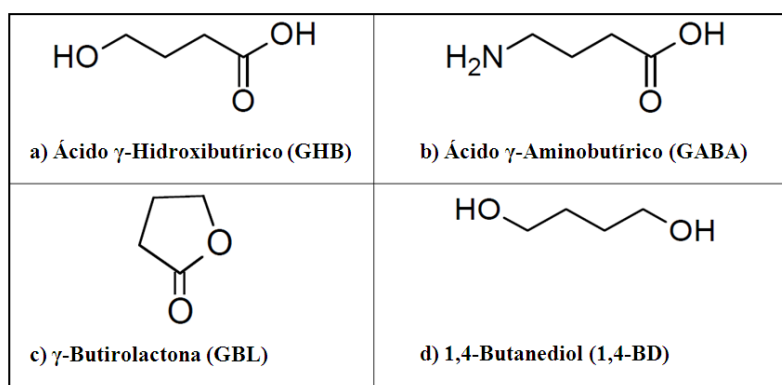


Figura 2 - Estrutura química dos compostos: a) ácido γ -hidroxibutírico (GHB); b) ácido γ -aminobutírico (GABA); c) γ -butirolactona (GBL) e d) 1,4-butanediol (1,4-BD) (Adaptado de (12)).

Quanto ao mecanismo de ação do GHB, apesar do mesmo não estar completamente esclarecido, pensa-se que este interfere com o metabolismo da glucose, com a regulação da temperatura, do fluxo sanguíneo e dos padrões de sono. Este composto estará ainda relacionado com o aumento dos níveis plasmáticos da hormona de crescimento e de prolactina nos humanos (22). No entanto, um dos principais efeitos do GHB parece ser a modulação da neurotransmissão dopaminérgica. Neste sentido, a administração de GHB conduz tanto à inibição dos neurónios dopaminérgicos, impedindo a libertação de dopamina (DOPA), assim como à estimulação da atividade da enzima necessária à síntese de DOPA, a tirosina hidroxilase. Consequentemente, ocorre uma acumulação de DOPA nas terminações nervosas (células pré-sinápticas) (13,14). Paralelamente, este composto pode interferir com os sistemas de neurotransmissão colinérgico e serotoninérgico (45).

Assim, o mecanismo de ação do GHB baseia-se na sua ligação, de forma reversível, a recetores específicos de GHB, recetores acoplados à proteína G. Estes são recetores de elevada afinidade, localizados maioritariamente, nas células pré e pós-sinápticas onde ocorre a libertação do GABA (12). Existem evidências de que os recetores de GHB têm dois centros ativos, de elevada e baixa afinidades, sugerindo a presença de dois tipos de ligantes diferentes (14,22). Nem o GABA nem a GBL demonstram afinidade para estes recetores (14).

Para além dos recetores específicos de GHB, o GHB possui, ainda, afinidade para com os recetores GABA. No entanto, contrariamente a outros depressores do SNC, como o etanol e as benzodiazepinas, que apresentam maior afinidade para com os recetores GABA_A, o GHB tem maior afinidade para com os recetores GABA_B (22). Todavia, os níveis endógenos de GHB que se ligam aos recetores GABA_B não são suficientes para permitirem qualquer atividade agonista e, consequentemente, qualquer efeito farmacológico, nomeadamente os efeitos psicoativos (12–14,22,45,46). Após administração exógena de GHB, a ligação deste composto aos recetores GABA_B ocorre de forma significativa, levando a uma hiperpolarização da membrana do neurónio e depressão do SNC (13). Este processo ocorre de forma célere, uma vez que o GHB facilmente atravessa a barreira hematoencefálica (22). Alguns efeitos psicoativos do GHB, que levam ao seu uso recreativo, podem estar relacionados com esta fraca atividade como agonista dos recetores GABA_B (45).

Quanto à biossíntese e metabolismo do GHB, como já referido na seção anterior e representado na **figura 1**, este pode ser originado a partir do neurotransmissor GABA. Outras possíveis fontes de GHB são os seus precursores GBL e 1,4-BD que são metabolizados em GHB, através de uma lactonase endógena e de uma desidrogenase alcoólica, respetivamente (13). Como representado na **figura 1**, finda a ação do GHB, ocorre o seu transporte ativo para o interior da célula, onde a enzima citosólica, GHB redutase, cataliza a sua conversão em SSA que, posteriormente, é convertido em ácido succínico pela SSA redutase. O ácido succínico é incorporado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e dá origem a CO_2 e H_2O . Uma pequena fração de GHB é ainda metabolizada via beta-oxidação, no fígado, antes de ser incorporado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Uma quantidade negligenciável é ainda eliminada pela urina (13).

Um composto com a estrutura química do GHB (**Fig. 2a**), com dois grupos funcionais, grupo hidroxilo e grupo carboxilo, será, teoricamente, um substrato apropriado para reações de conjugação, tais como glucuronização e sulfonização. Desta forma, recentemente, foi reportada a presença endógena de metabolitos do GHB, nomeadamente o metabolito glucuronizado do GHB, o GHB-glucurónido (GHB-GLUC) (**Fig. 3a**) e o metabolito resultante da sulfonização do GHB, o GHB sulfónico (GHB-SUL) (**Fig. 3b**) (47,48).

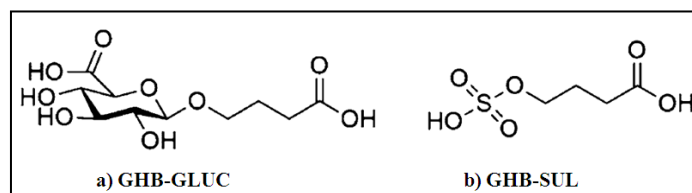


Figura 3 - Estrutura química dos metabolitos do GHB: a) GHB-glucurónido (GHB-GLUC); b) GHB sulfónico (GHB-SUL) (Adaptada de (49)).

1.3.1- Determinação analítica do GHB

A determinação analítica de GHB pode ser realizada em diferentes matrizes biológicas, sendo as mais utilizadas o sangue e a urina. O sangue é considerado uma das matrizes biológicas mais apropriadas para a identificação de compostos tóxicos, especialmente para a análise quantitativa dos mesmos, pois é a matriz que melhor reflete a correlação entre a concentração do tóxico e os seus efeitos (50). Como tal, apresenta-se, na **tabela 2**, o estado da arte dos métodos analíticos desenvolvidos e validados para determinação e quantificação do composto GHB em amostras de sangue (sangue total, plasma ou soro), nos últimos 10 anos.

Tabela 2 – Estado da arte dos métodos analíticos validados para a determinação do composto GHB em amostras de sangue (sangue total, plasma ou soro), nos últimos 10 anos.

Ano	Ref.	Amostra	Extração	Derivatização	Técnica Analítica	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Gama de Trabalho (ng/mL)	Recuperação
2006	(51)	Sangue Total	LLE	Sim	GC-MS/MS	10	2 500	2 500 - 100 000	90%
2007	(52)	Soro	LLE	Sim	LC-MS	30	600	2 000 - 100 000	70%
2011	(53)	Sangue Total	-	-	Ensaio Imunoenzimático	-	5 000	5 000 - 250 000	103 - 112%
2011	(54)	Plasma	LLE	Sim	GC-MS	10	10	10 - 200	-
2012	(55)	Sangue Total	SPE	Não	LC-MS/MS	650	1 300	2 600 - 312 300	117 - 140%
2012	(56)	Sangue Total	LLE	Não	Ensaio Imunoenzimático	1 300	4 500	-	-
2012	(57)	Soro	LLE	Sim	GC-MS	560	1 820	90 - 5 090	70,90%
2013	(58)	Plasma	-	Sim	GC-MS	-	2 000	2 000 - 150 000	-
		Sangue Total	-			-	3 500	3 500 - 200 000	-
2014	(59)	Sangue Total	LLE	Sim	GC-MS	-	500	500 - 40 000	-
2015	(60)	Soro	LLE	-	LC-MS/MS	280	960	5 000 -100 000	-
2016	(61)	Plasma	LLE	-	LC-MS/MS	200	500	-	> 75%
2015	(62)	Sangue Total	LLE	Sim	GC-MS	500	600	1 000 - 100 000	30%
2016	(44)	Sangue Total	LLE	Sim	GC-MS/MS	100	100	100 - 100 000	86%
2017	(63)	Plasma	LLE	Não	LC-MS/MS	110	340	2 000 – 5 000	-
2017	(25)	Plasma	LLE	Não	LC-MS/MS	200	500	500 - 500 000	90,10%

“-” – Não Divulgado; LLE – Extração Líquido-Líquido; SPE – Extração em Fase Sólida; LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação

A análise da **tabela 2** permite verificar que a maioria dos métodos publicados para a detecção de GHB em sangue total, soro ou plasma, se baseia em procedimentos de extração líquido-líquido. Esta tendência, também verificada para o GABA (**Tab.1**), pode ser justificada pela maior simplicidade e aplicabilidade, assim como pelo baixo custo associado ao método de LLE que, comparativamente à SPE, não requer, eventualmente, tantos gastos em solventes, reagentes e cartuchos de SPE (27).

Relativamente às técnicas analíticas utilizadas, são de salientar os métodos enzimáticos para a determinação analítica de GHB. Em 2009 foi comercializado o primeiro *kit* enzimático para determinação do GHB, no qual utilizam GHB desidrogenase recombinante para oxidar o GHB a SSA, enquanto o cofator NAD^+ é reduzido a $\text{NADH} + \text{H}^+$, sendo a reação monitorizada por espectrofotometria a 340nm (64). Este método, para além de requerer pouca quantidade de amostra, pode ter uma rapidez semelhante à dos métodos colorimétricos. Esta técnica permite o rastreio de GHB em diferentes matrizes biológicas, tais como sangue total, soro, urina e humor vítreo (53,56,65). Apesar deste tipo de metodologia ter, como principais características associadas, a rapidez, o elevado grau de automatismo e simplicidade (64), os métodos enzimáticos apresentam valores de LOD e de LOQ substancialmente superiores aos obtidos pelas restantes técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) (54,57,58,62), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (GC-MS/MS, do inglês *Gas Chromatography – tandem Mass Spectrometry*) (44,51). de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*) (25,52,55,60,61,63).

Apesar da natureza do GHB não favorecer a utilização do GC, dado o carácter polar do composto, o seu baixo peso molecular e a sua instabilidade térmica, que favorece a ciclização do composto em lactona, seja devido às elevadas temperaturas na entrada no injetor, seja por indução química devido ao pH baixo, esta é a técnica de quantificação do GHB mais utilizada nas últimas duas décadas (22,23,64,66). Estas características do GHB conduzem à necessidade de se realizar uma modificação química do composto antes da separação por GC para, posteriormente, se realizar a sua quantificação de forma fiável. Assim, para análise por GC, uma das alternativas passa pela ciclização do GHB no seu

precursor GBL, mais volátil, através da adição de um ácido, sendo outra alternativa a derivatização do composto recorrendo a reagentes de derivatização (64,66,67). A conversão de GHB em GBL levanta dificuldades, nomeadamente a garantia de que ocorre conversão total do composto para posterior quantificação, bem como o facto de impedir a diferenciação entre GBL e GHB (66). Por outro lado, a inserção de um passo de derivatização permite aumentar o peso molecular do composto, reduzir a sua polaridade, melhorar a volatilidade, a seletividade e a eficiência do método de separação (64). Em concordância, pela literatura consultada, maioritariamente recorre-se à derivatização do GHB, sendo a silylação a reação mais comum, utilizando os reagentes BSTFA:TMCS (99:1) (44,51,54,59,62).

A técnica de cromatografia líquida também é utilizada, embora em menor número, para a determinação de GHB (25,52,55,60,61,63). A LC não requer derivatização do composto nem a sua conversão química anterior à análise, sendo a preparação da amostra mais simples (55,64). Quanto à técnica de LC-MS/MS, é importante ter em consideração que ocorre conversão de parte do GHB em GBL na fonte de ionização de eletrospray (ESI), sendo necessária uma completa separação cromatográfica destes dois compostos para permitir diferenciar o GBL proveniente do GHB e o GBL real (68).

1.3.2- Determinação analítica do GHB-GLUC e do GHB-SUL

Como acima descrito, recentemente foi reportada a presença endógena de metabolitos do GHB, o GHB-GLUC (**Fig.3a**) e o GHB-SUL (**Fig.3b**) (47,48). Alguns estudos foram publicados após reporte da presença dos referidos metabolitos endógenos do GHB, estando apresentado, na **tabela 3**, o estado da arte de todos os métodos analíticos disponíveis na literatura para quantificação do GHB-GLUC e do GHB-SUL, em diferentes matrizes biológicas.

Tabela 3 – Estado da arte dos métodos analíticos validados para a determinação dos metabolitos endógenos do GHB, o GHB-GLUC e o GHB-SUL.

Ano	Ref.	Amostra	Extração	Derivatização	Técnica Analítica	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Gama de Trabalho (ng/mL)	Recuperação	Analito
2013	(69)	Urina	<i>Dilute and shoot</i>	Não	LC-MS/MS	25	100	100 - 10 000	79 - 108%	GHB-GLUC
2016	(49)	Plasma	LLE	Não	LC-MS	3	8	10-500	51,7 - 108%	
		Urina	<i>Dilute and shoot</i>	Não				25 - 20 000	-	
2016	(61)	Plasma	LLE	Não	LC-MS/MS	200	500	-	> 75%	
		LCR				300	1 000			
2016	(70)	Cabelo	LLE	Não	LC-MS/MS	-	0,48 ug/mg	0 - 50 ng/mg	62-65%	
	(63)	Plasma	LLE	Não	LC-MS/MS	3	8	8 – 500	-	
		Urina						8 – 20 000		
2017	(25)	Plasma	LLE	Não	LC-MS/MS	200	500	200 - 500 000	88,50%	
		Urina				200	500	200 - 500 000	94%	
		LCR				300	1 000	300 - 500 000	95%	
		Cabelo				0,2 ng/mg	0,5 ng/mg	0,2 - 100 ng/mg	85,40%	
2016	(49)	Urina	-	Não	LC-MS	2	6	10 - 1 000	-	GHB-SUL

“-” – Não Divulgado; LLE – Extração Líquido-Líquido; SPE – Extração em Fase Sólida; LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação

O interesse do estudo de possíveis metabolitos do GHB, passa pela sua possível utilização como biomarcadores de consumo deste composto, uma vez que os metabolitos conjugados poderão possuir maior tempo de meia vida comparativamente aos seus metabolitos não modificados, permitindo aumentar a janela de detecção do GHB (48). Assim, numa analogia com o etil glicuronídeo, que é reconhecido como excelente biomarcador para o consumo de álcool, devido ao seu tempo de meia vida no plasma ser superior ao do etanol,

Petersen *et al.* (47) estudaram a presença endógena de GHB-*O*- β -Glucurónido, resultante da glucuronização do GHB, pela enzima UDP-glucuronosiltransferase. Foi possível, então, a identificação de GHB-GLUC em amostras de urina humana, assim como a determinação das concentrações endógenas deste metabolito. No entanto, a grande variabilidade inter-individual observada no estudo não permitiu a validação do GHB-GLUC como biomarcador de consumo de GHB (47).

Em 2016, Wang *et al.* (70) foram pioneiros no estudo da presença de GHB-GLUC em cabelo humano, com fins forenses. Neste estudo verificou-se que o GHB-GLUC não é incorporado no cabelo em quantidades apreciáveis que permitam a distinção entre GHB endógeno e o proveniente do consumo exógeno (70). Ainda em 2016, Hanisch *et al.* (48) identificaram, na urina humana, o metabolito GHB-SUL. No mesmo ano, Mehling *et al.* (49) desenvolveram um método de HPLC-QTOF-MS, com recurso a um analisador tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*), para o GHB-SUL e para o GHB-GLUC em urina e plasma. No estudo citado não foi possível detetar o metabolito GHB-SUL em plasma humano sem consumo exógeno de GHB, sendo que, em urina, ambos os metabolitos foram detetados (49). Entretanto, em dois estudos (25,61), procedeu-se à quantificação de GHB-GLUC em amostras de LCR de pacientes diagnosticados com narcolepsia sob medicação com oxibato de sódio. Em ambos os referidos estudos, os resultados obtidos sugerem que o GHB-GLUC não atravessa a barreira hematoencefálica (25,61).

1.4- Formação *post-mortem* de GHB e de GABA

Está descrita a formação endógena *post-mortem* de GHB a níveis que podem atingir, em fluidos biológicos, concentrações que poderiam ser consideradas letais, sem suspeita prévia de consumo (67,71). A produção *post-mortem* de GHB não é apenas detetável em amostras de sangue, mas também noutros fluidos biológicos e tecidos, como a urina e o humor vítreo (45,62). Está também reportada, na literatura, a formação *post-mortem* de GABA (67,72). Ainda não é completamente conhecido o mecanismo pelo qual ocorre esta elevação *post-mortem* dos níveis de GHB e de GABA. No entanto, estão descritos na literatura várias possibilidades e mecanismos de comportamento (73).

Um dos mecanismos passa pela conversão enzimática de SSA, GABA e putrescina em GHB. Com efeito, após a morte, finda ou diminuída a atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, ocorre acumulação de ácido succínico, que pode ser convertido em SSA e,

consequentemente, em GHB. Considera-se que este mecanismo possa ser o principal responsável pela produção de GHB durante a fase inicial da atividade *post-mortem* (22,74). Por outro lado, como resultado de um processo natural de decomposição, ocorre libertação de GABA de vesículas de armazenamento. Este excesso de GABA pode ser exposto à GABA aminotransferase, ocorrendo a sua conversão em SSA e, posteriormente, em GHB (22,62,75). Estas teorias são suportadas por um estudo revisto em Couper *et al.* (22), no qual se verifica que a exposição da amostra *post-mortem* a radiações micro-ondas previne a acumulação de GHB, uma vez que causará a desnaturação das enzimas envolvidas. É ainda descrita como fonte *post-mortem* de produção de GHB a putrescina (1,4-butanediamina). Trata-se de uma poliamina biogénica presente em todas as células eucarióticas e procarióticas, a qual desempenha funções importantes ao nível da diferenciação e proliferação celulares. A conversão da putrescina em GABA ocorre por ação das enzimas diamina oxidase e aldeído desidrogenase (12,22,62,75).

Sabe-se que o GHB não é o produto final de nenhuma das vias metabólicas acima descritas (62), assim como se tem conhecimento que ocorre desnaturação de enzimas, devido à diminuição do pH à medida que o processo normal de decomposição ocorre (22). Neste sentido, seria expectável que ocorresse uma diminuição dos níveis de GHB *post-mortem* aquando da falta de substrato disponível e/ou da desnaturação enzimática, pelos motivos descritos. Esta hipótese é corroborada por um estudo recente (71), cujos resultados demonstram aumento dos níveis de GHB nas primeiras 72 horas, seguidas de uma diminuição destes para níveis ainda mais baixos do que os níveis considerados basais (71). Por outro lado, os resultados apresentados por Moriya e Hashimoto (75) sugerem que o aumento dos níveis de GHB *post-mortem* ocorre também por ação bacteriana na metabolização da glucose a ácido succínico, via fosfoenolpiruvato e oxaloacetato (75). Outros autores defendem ainda a possibilidade de alguns microrganismos desempenharem um papel importante na produção de GHB, pela degradação do neurotransmissor GABA (76). Para além do descrito, existem ainda numerosos fatores que podem afetar a produção de GHB *post-mortem*, entre os quais o período de tempo após a morte e a temperatura a que os cadáveres são colocados (59).

Verifica-se assim que, no caso da determinação dos níveis de GHB *post-mortem*, existe uma dificuldade acrescida na interpretação dos resultados, nomeadamente na distinção entre níveis endógenos e exógenos (73). Para colmatar esta dificuldade, têm vindo a ser

desenvolvidos estudos com o objetivo de estabelecer níveis de *cut-off*, ou seja, níveis de concentração de GHB *post-mortem* acima dos quais é considerado consumo exógeno de GHB e abaixo dos mesmos sejam considerados níveis endógenos. Neste sentido, na literatura, foram propostos níveis de *cut-off* de 30 000 ng/mL e de 10 000 ng/mL, para concentrações de GHB *post-mortem* em sangue e em urina, respetivamente (44,59,62).

A determinação dos níveis de GHB *post-mortem* poderia contribuir para a determinação do intervalo *post-mortem* (PMI) que é, por definição, o intervalo de tempo entre a morte e a autópsia, na qual é realizada a colheita de amostras (67). A importância da determinação do PMI é essencial em casos onde dados biológicos, como os níveis de potássio no humor vítreo (77–79), ou avaliações clínicas, tais como a temperatura corporal (79,80) e a estimulação muscular, não são suficientes para estimar de forma fiável o PMI, nomeadamente devido a alterações *post-mortem* (67). Com efeito, na literatura está descrita uma correlação entre as concentrações de GHB em sangue total e o respetivo PMI (59,71). Foi também descrito (67), em modelo animal, não só um aumento significativo das concentrações de *post-mortem* de GHB no SNC e no sangue, como também um aumento estatisticamente significativo das concentrações *post-mortem* de GABA no fígado, no músculo e no sangue (67). Em concordância, Donaldson *et al.* (72), verificaram um aumento dos níveis *post-mortem* de GABA em plasma sanguíneo, em modelo animal. Neste estudo, os autores sugerem que o GABA é libertado através de eritrócitos, linfócitos e plaquetas, para modular a resposta imunitária e a contração da parede arterial (72).

Assim, poderia haver benefício, ao nível da determinação do PMI, em realizar um estudo que avalie, de forma simultânea, os níveis *post-mortem* de vários compostos, entre os quais se podem sugerir o GHB, o GHB-GLUC e o GABA. Numa tentativa de se utilizarem eventuais metabolitos como marcadores do PMI, este tipo de estudo poderia contribuir para uma determinação mais precisa deste mesmo intervalo (71).

1.5- Fatores que influenciam as concentrações de GHB e dos seus metabolitos

Existem diversas condições, tais como doenças que envolvam o metabolismo do GHB ou interações deste composto com outras substâncias, que podem conduzir a níveis anormais de GHB, bem como dos seus metabolitos e, conseqüentemente, dificultar a interpretação dos mesmos. Assim, é importante ter em conta, por exemplo, a doença

metabólica rara em que se verifica deficiência da semialdeído succínico desidrogenase (SSADHD, do inglês *Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency*). A SSADHD é uma doença hereditária autossômica recessiva, em que ocorre uma falha na estrutura da SSA desidrogenase, verificando-se, assim, níveis elevados de GHB e de GABA nos fluidos biológicos (81,82). Estes metabolitos, GHB e GABA, são considerados marcadores bioquímicos da SSADHD. Esta doença pode, ainda, influenciar os níveis de outros metabolitos do GHB, tais como o GHB-GLUC (47). Nestes casos, em que os níveis anormalmente elevados de GHB encontrados são erroneamente associados a um consumo exógeno do composto que, de facto, não terá ocorrido, sugere-se uma segunda determinação para que sejam estabelecidos os níveis basais de referência (71).

É ainda importante entender a interação entre o GHB e outras substâncias. De facto, a sua interação com algumas substâncias medicamentosas tem sido descrita na literatura, embora ainda seja uma área com pouca informação (45). Neste sentido, algumas substâncias medicamentosas, tais como o valproato, etosuximida, ácido salicílico, amobarbital, clorpromazina, fenitoína, disulfiram e cianeto, têm sido descritas como potenciais inibidoras da enzima GHB desidrogenase (22). No entanto, ainda não está completamente esclarecido a que níveis de concentração estas substâncias causam inibição significativa do metabolismo do GHB (22,83). Quanto ao valproato, frequentemente utilizado na terapêutica para a epilepsia, é sugerido na literatura que, para além de inibidor da GHB desidrogenase, esta substância atua como potente inibidor *in vitro* da SSA desidrogenase induzindo, assim, um aumento dos níveis de GHB *in vitro* (83,84). Demonstrou-se que o valproato aumenta, significativamente, a atividade da enzima responsável pela conversão de ácido glutâmico a GABA, a ácido glutâmico descarboxilase. Devido ao aumento da atividade da descarboxilase referida seria expectável não só o aumento da concentração de GABA, como também de GHB e dos seus metabolitos. Contudo, sugere-se que o valproato causa, também, a inibição da GABA aminotransferase, que converte o GABA a SSA, bloqueando assim a conversão em GHB (45,83).

1.6- Validação de um método analítico

Após escolha do método analítico mais adequado ao propósito a que se destina, existem diversos parâmetros de validação, cujo estudo e avaliação pretendem conceder

credibilidade aos resultados obtidos. Os referidos parâmetros incluem seletividade/especificidade, os limites de detecção e de quantificação, a gama de trabalho, linearidade/modelo de regressão, a precisão e a exatidão, a recuperação e a robustez (85). Relativamente à seletividade, esta é, por definição, a capacidade que um método bioanalítico apresenta para determinar e diferenciar, de forma inequívoca, um analito em particular na presença de outros constituintes da amostra, na qual será expectável que o analito esteja presente (85,86).

O limite de detecção (LOD) de um método, é definido como a menor concentração de analito que é possível detetar e diferenciar do ruído, com uma certeza estatisticamente conhecida (85,87). Quanto ao limite inferior de quantificação (LOQ), este pode ser definido como a menor concentração de analito presente numa amostra passível de ser determinada quantitativamente com a precisão e a exatidão adequadas. A concentração inferior ao LOQ, a quantificação não é aceitável, sendo apenas possível a um método produzir resultados qualitativos e semiquantitativos (86,87).

No desenvolvimento de um método analítico de quantificação é necessário estabelecer uma gama de trabalho, isto é, o intervalo de concentrações máxima e mínima no qual o analito será determinado, com base numa determinada curva de calibração (88). A curva de calibração é, dentro da gama de trabalho definida, uma relação conhecida entre o sinal analítico e a concentração do mesmo, com base em padrões de calibração. O número de pontos a utilizar deve ser suficiente para definir de forma adequada a relação entre a concentração de analito e a resposta analítica, devendo ser estes níveis o mais equidistantes possível e abranger todo o intervalo escolhido (85,87). É ainda de ter em conta que será necessário um maior número de pontos para modelos não lineares da curva de calibração, comparativamente a modelos lineares (88).

Relativamente à avaliação da exatidão esta, em sentido restrito, é afetada por erros sistemáticos (*bias*) e erros aleatórios (precisão) (85,87). A exatidão é, portanto, estudada como uma entidade com duas vertentes, a veracidade e a precisão, sempre considerando como uma entidade global a incerteza associada (85). Quanto aos erros sistemáticos, estes representam a componente do erro de medição que permanece constante ou varia de forma previsível. Assim, um erro sistemático é definido como a diferença entre a média dos resultados de uma série de medições e um valor de referência aceite como exato, sendo

expresso, por norma, como um desvio percentual do valor de referência aceite (87). No que diz respeito à precisão, esta representa a proximidade entre os resultados analíticos quando o procedimento é aplicado a múltiplas alíquotas da mesma amostra homogénea nas mesmas condições permitindo, assim, avaliar o grau de dispersão entre uma série de medições. A precisão pode ser avaliada a três níveis: a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade (88). A repetibilidade, também designada precisão intra-dia, expressa a precisão sob iguais condições operacionais, num curto intervalo de tempo. Quanto à precisão intermédia, esta expressa variações de precisão no mesmo laboratório, definindo exatamente quais as condições a variar, tais como, o dia, o analista e/ou equipamento. Por último, o terceiro nível de precisão referido, a reprodutibilidade, expressa a precisão entre laboratórios (86–88).

Outro parâmetro a ser avaliado para a validação de um método analítico é a recuperação, que se relaciona com a eficiência de extração de um procedimento analítico. Este parâmetro pode ser calculado como a percentagem de resposta do analito após o procedimento extrativo e o processamento da amostra, comparativamente a uma amostra na qual o analito apresenta uma concentração correspondente a 100% de recuperação (87). Pode ainda fazer-se diferenciação entre recuperação absoluta e relativa. Neste sentido, a recuperação absoluta expressa a variação entre a quantidade obtida após extração e a quantidade decorrente da adição após o procedimento de extração, enquanto a recuperação relativa expressa a mesma variação mas no caso de amostras que são submetidas a outros tratamentos que não a extração, tais como a derivatização do analito, uma vez que os compostos derivatizados, por norma, não estão disponíveis como substâncias de referência (87,88). Quanto à robustez, esta determina a suscetibilidade de um método a pequenas alterações que podem ocorrer durante as determinações analíticas de rotina, tais como, pequenas alterações de pH, composição de fases móveis, temperatura, desgaste das colunas analíticas, entre outros (85–87).

1.7- Objetivos

Através da revisão da literatura efetuada é possível concluir que a determinação analítica exclusiva do GHB quando existem suspeitas de consumo recreativo deste composto e/ou em casos de abuso sexual sob efeito do mesmo, poderá ser limitativa, devido à eliminação rápida do GHB (cerca de 12 horas). Assim, é emergente a necessidade de alternativas para colmatar a dificuldade referida e, neste sentido, a recente descoberta do metabolito glucuronizado do GHB (GHB-GLUC) assume interesse, uma vez que poderá contribuir para o aumento da janela de deteção do GHB. Com o mesmo objetivo, a inclusão do GABA no painel de analitos identificados inclui, eventualmente, informação complementar. É ainda relevante a utilização do GHB como indicador *post-mortem*, havendo diversos estudos que correlacionam as concentrações de GHB com o respetivo intervalo *post-mortem*. Neste contexto, a possibilidade da utilização dos dados fornecidos pela quantificação do metabolito GHB-GLUC poderá ser pertinente. Paralelamente, na literatura, o neurotransmissor GABA foi também apontado como um potencial biomarcador para a determinação do PMI.

Deste modo, os objetivos deste trabalho incluem o estudo das vias de fragmentação dos compostos GHB-GLUC e GABA após ionização por impacto eletrónico em GC-MS/MS, para posterior escolha dos iões de quantificação e diagnóstico. Após este passo, pretende-se efetivar a validação de um método analítico em GC-MS/MS, cumprindo os critérios definidos pelo SQTF-N, para a deteção e quantificação de GHB-GLUC e de GABA em amostras reais de sangue total. Idealmente, o referido método seria aliado ao método já existente e validado, no SQTF-N, para a determinação de GHB, com o objetivo de realizar a determinação conjunta de GHB, GHB-GLUC e de GABA. Adicionalmente, o método desenvolvido e validado será aplicado a amostras reais correspondentes a casos existentes de intoxicação por GHB, bem como a uma série de amostras *post-mortem*, com a particularidade de se conhecer a data e hora do óbito, com recolha de amostra de sangue periférico em dois momentos diferentes. Não está reportado, na literatura, nenhum método analítico em GC-MS/MS para a determinação simultânea do GHB, do GHB-GLUC e do GABA em amostras reais humanas; nem a determinação, por qualquer método analítico, destes três metabolitos em amostras *post-mortem* humanas. Face ao exposto, poderá ser possível, com a metodologia apresentada, inferir acerca da possibilidade da utilização do GHB-GLUC e do GABA no possível aumento da janela de deteção do GHB bem como do

comportamento *post-mortem* destes compostos e a sua eventual contribuição para a estimativa mais exata do PMI.

2– Material e Métodos

2- Material e Métodos

2.1- Reagentes, solventes e padrões analíticos

Para o desenvolvimento dos diferentes procedimentos analíticos estudados, utilizaram-se diversos solventes, reagentes e padrões analíticos. Os solventes metanol *gradient grade*, acetonitrilo (ACN), acetato de etilo, ácido fórmico e amônia (25%) foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha), a água ultrapura foi obtida a partir de um equipamento Milli Q, da *Millipore* (Molsheim, França) e o formato de amônia (99%) foi adquirido à *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, EUA). O reagente de derivatização utilizado foi o BSTFA com 1% de TMCS, adquirido à *Supelco* (Bellefonte, EUA). Relativamente aos padrões analíticos utilizados, o ácido γ – hidroxibutírico (GHB) e o ácido γ – hidroxibutírico deuterado (GHB-D₆) foram adquiridos à *Lipomed* (Arlesheim, Suíça), o ácido γ -aminobutírico (GABA) foi obtido à *ChromaDex* (Irvine, EUA), ao passo que o ácido γ -hidroxibutírico glucuronizado (GHB-GLUC) e o ácido γ -hidroxibutírico glucuronizado deuterado (GHB-GLUC-D₄) foram cedidos por Petersen *et al.* (69). Partindo dos padrões analíticos em pó, ou seja, os padrões do GHB-GLUC, do GHB-GLUC-D₄ e do GABA, prepararam-se soluções-*stock* em metanol, a concentrações de 1 mg/mL. Posteriormente, prepararam-se soluções de trabalho de 1 mg/L e de 10 mg/L em metanol. Todas as soluções foram armazenadas e mantidas a -20°C, como descrito na literatura (25,70).

Para os procedimentos extrativos prepararam-se diferentes misturas de solventes, entre as quais uma mistura metanol/ ácido fórmico em acetonitrilo a 0,1% (10/90, v/v); uma mistura água/metanol/NH₄OH (94,5/5/0,5, %/%/%); uma mistura metanol/ NH₄OH (2%) (95/5, %/%) e, também, uma mistura de metanol/acetonitrilo/2 mM de formato de amônia contendo 8% de ACN. Para esta mistura, mediu-se 0,0633g de formato de amônia e diluiu-se em 46 mL água ultrapura e 4 mL de acetonitrilo, de forma a se obter uma solução a 2 mM de formato de amônia contendo 8% de ACN; a esta solução adicionaram-se 25 mL de metanol e 25 mL de ACN.

2.2- Sistema de GC-MS/MS

O equipamento de GC-MS/MS utilizado foi um cromatógrafo *Bruker 450-GC* (Bruker, Bremen, Alemanha), equipado com um injetor automático e uma coluna capilar

J&W 5-MS (Agilent, Santa Clara, EUA), acoplado a um Espetrómetro de Massa com um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo *Bruker 300-MS* (Bruker, Bremen, Alemanha). A temperatura do GC foi ajustada, inicialmente, a 60°C por 2 minutos, aumentou-se para 120°C a uma velocidade de 10°C/min, depois aumentou-se para 300°C a 30°C/min com 6 minutos de espera final, levando a 20 minutos de tempo total de corrida. As temperaturas do injetor, da linha de transferência e da fonte de ionização foram 250°C, 280°C e 260°C. O gás de arrasto utilizado foi o Hélio BIP (He), a um fluxo de 1 mL/min e a injeção de 2 µL de amostra foi realizada em modo *splitless*.

2.3- Desenvolvimento do método analítico

Para a avaliação dos diferentes parâmetros da validação do método analítico o ideal seria recorrer a amostras controlo de sangue, ou seja, amostras de sangue sem os analitos que se pretendem estudar. No entanto, dado o carácter endógeno dos analitos em estudo, o GHB-GLUC e o GABA, optou-se por se utilizar água como amostra controlo. Têm-se, como exceção, a validação do procedimento extrativo e o rendimento da extração, onde não se recorreu à água como controlo, tendo-se utilizado sangue.

2.3.1- Procedimento extrativo

Para a validação do procedimento extrativo testaram-se diferentes solventes para a extração líquido-líquido (LLE) e um outro procedimento extrativo por extração em fase sólida (SPE). No que diz respeito ao único procedimento em fase sólida (SPE), optou-se por se adaptar o protocolo descrito por Richard *et al.* (67), para a extração de GHB, GABA, 1,4-BD e GBL, no caso aplicado a diferentes tecidos animais.

Neste trabalho, o procedimento de SPE foi aplicado a amostras controlo de sangue, bem como a amostras desse mesmo sangue fortificado com GHB, GHB-GLUC e GABA. Este procedimento foi desenvolvido utilizando colunas OASIS[®] MCX, fornecidas pela WATERS[™] (Waters Corporation, Milford, EUA). No procedimento testado, inicialmente 200 µL de amostra foram diluídos em 1 mL de tampão fosfato (KH₂PO₄, 0,1 M). Procedeu-se ao condicionamento da coluna com 2 mL de metanol e, posteriormente, equilibrou-se a coluna com o mesmo volume de água, seguindo-se a introdução das amostras na coluna. De

seguida, adicionou-se 1 mL de uma mistura previamente preparada de metanol/ácido fórmico em acetonitrilo (10/90, v/v), sendo o objetivo deste passo a eluição dos compostos acídicos, nomeadamente do GHB e, possivelmente o GHB-GLUC. Após eluição, realizou-se lavagem da coluna com 2 mL de água e 2 mL de água/metanol/NH₄OH (94,5/5/0,5, %/%/%). Seguiu-se a eluição dos compostos básicos, como é o caso do GABA, com a adição de 2 mL de metanol/NHOH (2%) (95:5, %/%). Os tubos de vidro com os eluatos foram secos e concentrados, pela evaporação dos eluentes, em evaporador rotativo (Centrivap, Labconco), durante uma hora a 45°C, sob vácuo. Seguiu-se o procedimento de derivatização descrito abaixo na secção 2.4. com posterior transferência dos extratos para *inserts* de reação dentro de *vials*.

Para o procedimento extrativo de precipitação proteica com metanol, adicionaram-se 100 µL de amostra controlo de sangue a um *eppendorf* de 1,5 mL, seguidos da adição de 10 µL solução de padrão interno (GHB-D₆) a 1 mg/L e de 200 µL de metanol. De seguida agitou-se, no vórtex, durante cerca de 30 segundos, com sucessiva centrifugação a 4000 RPM, durante 15 minutos. Findo o tempo da centrifugação retirou-se o sobrenadante para um *vial*, seguindo o procedimento de preparação de amostras descrito abaixo. Os restantes procedimentos LLE foram semelhantes ao descrito anteriormente para a precipitação proteica com metanol, alterando apenas o solvente utilizado. Testaram-se, como solventes, o acetato de etilo, o acetonitrilo e, também, a mistura metanol:acetonitrilo:formato de amónia 2 mM (25:25:50), adaptada de Wang *et al.* (70).

2.4- Preparação das amostras

Após se proceder à extração, colocaram-se os eluatos num evaporador de azoto (Turbovap[®] LV, Biotage, Uppsala, Suécia) até secagem completa. Seguiu-se o processo de derivatização química, que envolveu a adição de 50 µL de reagente de derivatização (BSTFA+TMCS, 99:1), com posterior aquecimento a 65°C num bloco de aquecimento (MULTI-BLOK[®] Heater, Lab-Line, Mumbai, Índia), em banho seco. Findos 30 minutos, retiraram-se os *vials* do banho seco, ficando o extrato preparado para a análise instrumental.

Antes de se proceder à validação do método analítico, prepararam-se curvas de calibração de amostras controlo negativas (água) fortificadas com os analitos de interesse

(GHB-GLUC, GABA e padrão interno). Após derivatização, procedeu-se à injeção das mesmas no espectrómetro de massa. Realizou-se, também, o congelamento das amostras a -20°C, tendo-se voltado a injetar cada uma das curvas após descongelamento, para comparação dos resultados obtidos pré e pós congelamento. Esses passos de pré-validação tiveram como objetivo a avaliação do comportamento dos analitos, nomeadamente a linearidade, assim como a avaliação da estabilidade dos mesmos à congelação.

2.5- Análise de amostras reais e análise estatística

Após a validação do método analítico pretendeu-se quantificar os compostos em estudo, inclusive o GHB, em amostras reais. Para tal aplicou-se o procedimento descrito anteriormente, preparando-se uma curva de calibração para, posteriormente, se quantificarem as amostras reais.

Procedeu-se ao estudo de uma amostra de soro positiva para GHB, à única amostra, até à data, com deteção positiva para GHB, disponível a nível nacional. Foram ainda estudadas amostras de sangue periférico *post-mortem* de 9 amostras com data e hora de óbito conhecidas. Estas amostras, para cada processo, foram colhidas em dois momentos diferentes, tendo uma das colheitas sido realizada aquando da admissão do cadáver e outra no momento da autópsia.

Os resultados experimentais são apresentados em termos de média \pm desvio padrão. A verificação de eventuais diferenças entre as concentrações de GHB (ng/mL) entre géneros, na primeira e na segunda colheita, foi realizada com recurso ao teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Para a comparação entre as concentrações do composto em estudo dos indivíduos com idade superior a 50 anos e dos indivíduos com idade inferior a 50 anos, realizou-se um *t-test* não emparelhado, para cada uma das colheitas. A comparação entre a concentração de composto obtida na primeira e na segunda colheita foi efetuada com recurso a um *t-test* emparelhado. A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* PRISM® GraphPad 7 (La Jolla, EUA) para o *Windows*. Para se detetar possíveis associações entre as concentrações sanguíneas de GHB e o PMI, calculou-se o coeficiente de *Pearson* (r), recorrendo à função PEARSON do programa informático *Excel*® (Microsoft, Redmond, EUA).

3— Resultados e Discussão

3- Resultados e Discussão

3.1- Estudo das vias de fragmentação dos compostos em estudo após Ionização por Impacto Eletrónico em GC-MS/MS

Esta secção tem como objetivo o estudo da via de fragmentação dos compostos, GHB-GLUC e GABA, após derivatização com o reagente de derivatização BSTFA+1%TMCS, por ionização por impacto eletrónico (EI), em GC-MS/MS. É de salientar que não existe na literatura nenhum estudo das vias de fragmentação, nem do GHB-GLUC, nem do GABA, sendo que o presente trabalho procura contribuir para o preenchimento de uma lacuna existente atualmente. Este estudo inicial tem relevância para a escolha do ião precursor e posterior escolha dos iões diagnóstico, tendo como objetivo a consequente quantificação destes compostos em amostras reais.

3.1.1- Injeção em *full SCAN*

O presente trabalho iniciou-se com a derivatização de soluções padrão de GABA, GHB-GLUC e GHB-GLUC-D₄ com BSTFA+1% TMCS. Esta reação de sililação ocorre por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), em que há substituição de hidrogénios reativos, como é o caso dos grupos OH e NH₂, por grupos trimetilsilano (TMS) (89). Na **figura 4** estão representados os compostos esperados após reação de derivatização dos compostos em estudo.

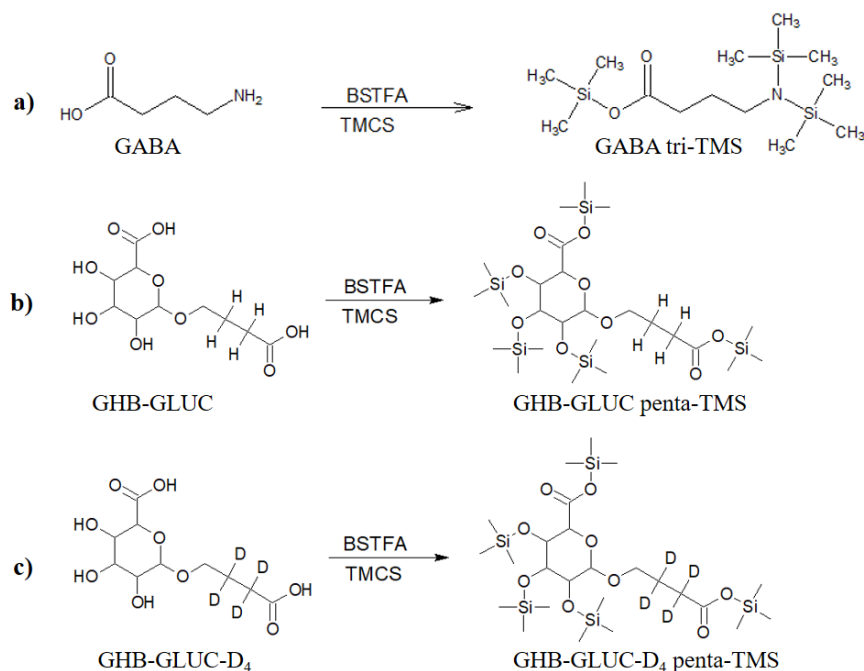


Figura 4 - Produtos da reação de derivatização com o reagente de derivatização BSTFA:1% TMCS do GABA (**Fig. 4a**), do GHB-GLUC (**Fig. 4b**) e do GHB-GLUC-D₄ (**Fig. 4c**).

Após o procedimento de derivatização, procedeu-se à injeção, em separado, das soluções padrão de GABA, GHB-GLUC e de GHB-GLUC-D₄, assim como do reagente de derivatização, de forma a obter os espectros GC-EI/MS dos mesmos, em modo *full SCAN*, representados na **figura 5**. O modo *SCAN* efetua um varrimento contínuo do quadrupolo numa determinada gama de razões massa/carga (m/z) pré-definida. Este procedimento inicial permite a identificação dos diferentes compostos, assim como a determinação do seu tempo de retenção (t_r) e ainda a caracterização das respetivas massas moleculares, pela análise dos iões formados na fonte após ionização por EI. Na **tabela 4** estão descritos os tempos de retenção dos compostos em estudo, verificando-se que é possível separar todos os compostos em termos cromatográficos, nas condições estabelecidas.

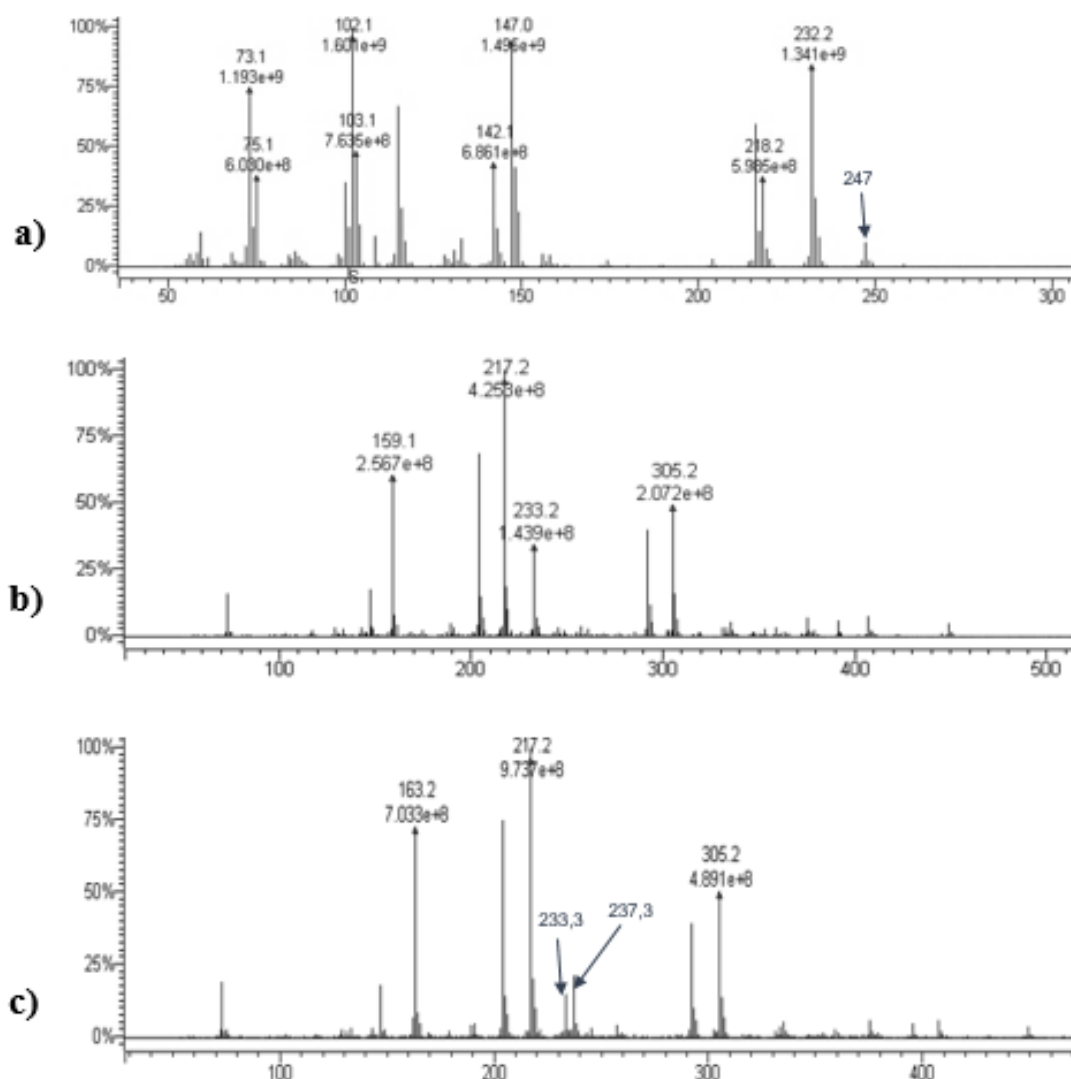


Figura 5 – **a)** Espectro de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→500) do GABA sililado, sendo o íon molecular do GABA di-TMS, a m/z 247. **b)** e **c)** Espectros de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→660) do GHB-GLUC sililado (**Fig. 5b**) e do GHB-GLUC-D₄ sililado (**Fig. 5c**).

Tabela 4 - Tempos de retenção dos compostos GABA di-TMS, GHB-GLUC sililado e GHB-GLUC-D₄ sililado, através da injeção em modo *full SCAN* de soluções-padrão de GABA, de GHB-GLUC e de GHB-GLUC-D₄ após derivatização química.

Composto	Tempo de Retenção (min.)
GABA di-TMS	9,54
GHB-GLUC sililado	14,10
GHB-GLUC-D ₄ sililado	14,11

Pela análise do espectro de massa GC-EI/MS do GABA (**Fig. 5a**) foi possível verificar a presença do ião molecular ($[M]^{+}$) do GABA di-TMS, a m/z 247, com uma abundância relativa bastante baixa ($<1\%$), ao tr de 9,54 minutos (**Tab. 4**). É ainda de realçar que este ião não se encontrava no espectro da amostra controlo contendo apenas o reagente de derivatização. A baixa abundância relativa do $[M]^{+}$ seria expectável, uma vez que está descrito que o $[M]^{+}$ de alguns compostos não é suficientemente estável de modo a ser visível, com abundância apreciável, em espectros EI (90). Está ainda descrito que os espectros de massa de derivados TMS frequentemente não apresentam $[M]^{+}$ (89), o que poderá justificar o facto de não se verificar a presença do $[M]^{+}$ no espectro MS do GHB-GLUC (**Fig. 5b**). Assim, contrariamente ao GABA, neste ponto não é possível ter conhecimento acerca de qual derivado sililado do GHB-GLUC se obtém após a reação de derivatização (**Fig. 4**), se o GHB-GLUC mono-TMS (m/z 352), di-TMS (m/z 424), tri-TMS (m/z 496), tetra-TMS (m/z 568) ou penta-TMS (m/z 640). Pela comparação do espectro de GC-EI/MS de GHB-GLUC (**Fig. 5b**) com o espectro do análogo deuterado (GHB-GLUC-D₄) (**Fig. 5c**) foi possível identificar que os compostos GHB-GLUC e GHB-GLUC-D₄ eluem a tr 14,10 e 14,11 minutos, respetivamente (**Tab. 4**).

3.1.2- Estudo da via de fragmentação do GABA

Nesta secção encontra-se apresentado o estudo da via de fragmentação do GABA estando, que inclui uma análise detalhada dos fragmentos de GABA di-TMS formados na fonte, após ionização por EI. Neste sentido, apresenta-se na **figura 6** o espectro de massa GC/EI-MS do derivado sililado do GABA com a representação das estruturas químicas propostas para cada um dos fragmentos visíveis no espectro.

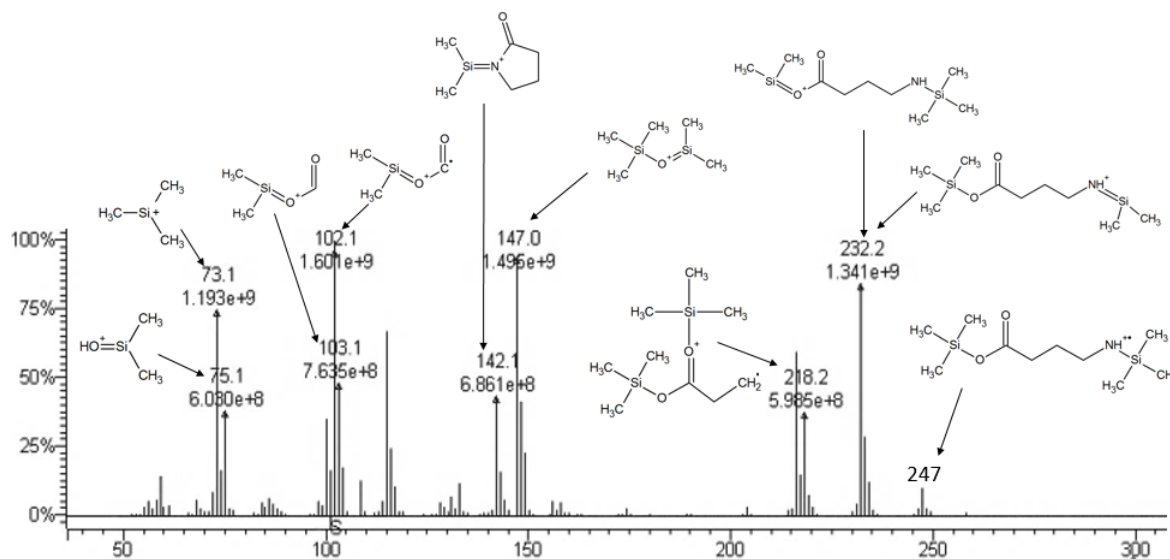


Figura 6 – Espetro de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→500) do GABA di-TMS e proposta de respectivas estruturas químicas dos fragmentos.

Pela análise do espectro de massa representado na **figura 6** é possível verificar a presença de fragmentos de massas mais baixas, como é o caso dos fragmentos a m/z 73 e a m/z 75, correspondentes aos iões $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ e $[\text{HO}=\text{Si}(\text{CH}_3)_2]^+$, respetivamente. Os referidos iões correspondem ao rearranjo dos grupos trimetilsilano e estão bem descritos na literatura como característicos dos derivados de TMS, nomeadamente em compostos dissililados (91,92). Relativamente aos iões de maior massa, estes devem ser originados a partir da fragmentação do ião molecular, m/z 247, no caso do GABA di-TMS (90).

Desta forma, partindo do ião molecular e com base na literatura, podem-se deduzir os mecanismos de fragmentação mais prováveis de forma a obter os fragmentos formados na fonte. O fragmento de maior massa no espectro GC-EI/MS do GABA-di-TMS (**Fig. 6**), a m/z 232, corresponde a uma perda de 15 Da relativamente ao ião molecular, ou seja, é um ião $[\text{M}-15]^+$. Para a formação deste ião poderia ocorrer a perda de um radical $\cdot\text{NH}$ ou a perda de um grupo metilo (Me), por uma clivagem alfa (90). Está descrito que a presença de um ião com elevada abundância $[\text{M}-\text{NH}]^+$ não é comum, sendo este considerado um ião anómalo (90). Para além disso, verifica-se que a perda de um grupo Me ligado ao Si é característica dos derivados de TMS (93,94). Assim, considera-se o mecanismo mais provável para a formação do ião m/z 232 a perda do grupo Me de qualquer um dos dois grupos TMS do ião molecular, representado na **figura 7**.

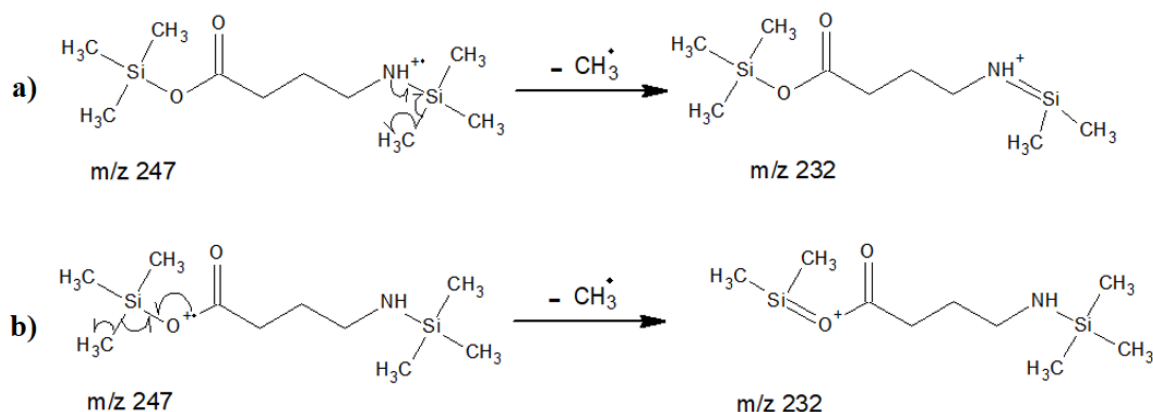


Figura 7 - Proposta de mecanismos de fragmentação para formação do íon fragmento a m/z 232, a partir do íon molecular a m/z 247.

Neste estudo, sugere-se que ocorre a formação dos íões fragmento a m/z 142, a m/z 147 e a m/z 103, por fragmentação do íon precursor a m/z 232. Na **figura 8a** apresenta-se o mecanismo proposto para a formação do íon fragmento a m/z 142, a partir do íon precursor a m/z 232. Esta fragmentação corresponde à perda de um fragmento neutro de 90 Da, característico da eliminação de um grupo TMSOH (93). Com base na literatura (91,93,95,96), nos derivados de TMS é ainda frequente a presença de um pico a m/z 147 com elevada abundância relativa, nomeadamente em compostos com mais do que um grupo trimetiloilo (-OSi(CH₃)₃) (95). No caso do GABA di-TMS existe apenas um grupo trimetiloilo, no entanto, também se observa um pico a m/z 147 com abundância elevada. Na **figura 8b** apresenta-se o mecanismo proposto para a formação desse mesmo fragmento correspondente ao rearranjo dos grupos sililados, formação de um intermediário cíclico e consequente eliminação neutra do composto cíclico 2-pirrolidona. Relativamente à formação do íon fragmento a m/z 103, propõe-se a eliminação do composto cíclico [C₆H₁₅NSi], cujo mecanismo se encontra representado na **figura 8c**.

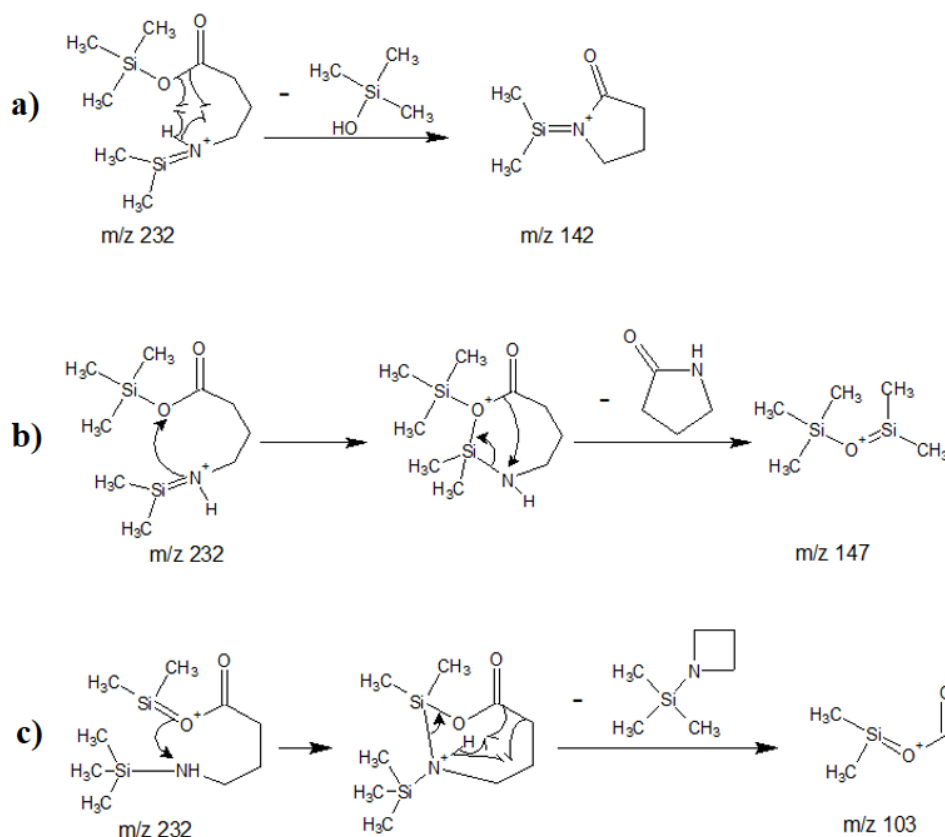


Figura 8 - Proposta de mecanismos de fragmentação para formação dos íões fragmento a m/z 142, a (Fig. 8a); assim como dos íões fragmento a m/z 147 (Fig. 8b) e a m/z 103 (Fig. 8c), a partir da fragmentação do ião precursor a m/z 232.

Na **figura 9** encontram-se representados os mecanismos propostos para a formação dos restantes íões fragmento, a m/z 218 (**Fig. 9a**) e a m/z 102 (**Fig. 9b**), a partir do ião molecular, a m/z 247. Para a formação do ião fragmento a m/z 218 propõe-se uma migração inicial do grupo TMS para o grupo carboxilo, com a eliminação neutra da metanimina [$\text{CH}_2=\text{NH}$] representada na **figura 9a**. O mecanismo descrito foi considerado o mais provável dada a tendência migratória dos grupos TMS descrita em derivados de TMS após ionização por EI, tendo-se demonstrado que esta migração ocorre preferencialmente para grupos carbonilo, hidroxilo e ligações duplas carbono-carbono (97). Relativamente ao ião fragmento a m/z 102, cujo mecanismo está descrito na **figura 9b**, propõe-se uma eliminação neutra inicial do CH_4 (89), com consequente eliminação do fragmento [$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NSi}$].

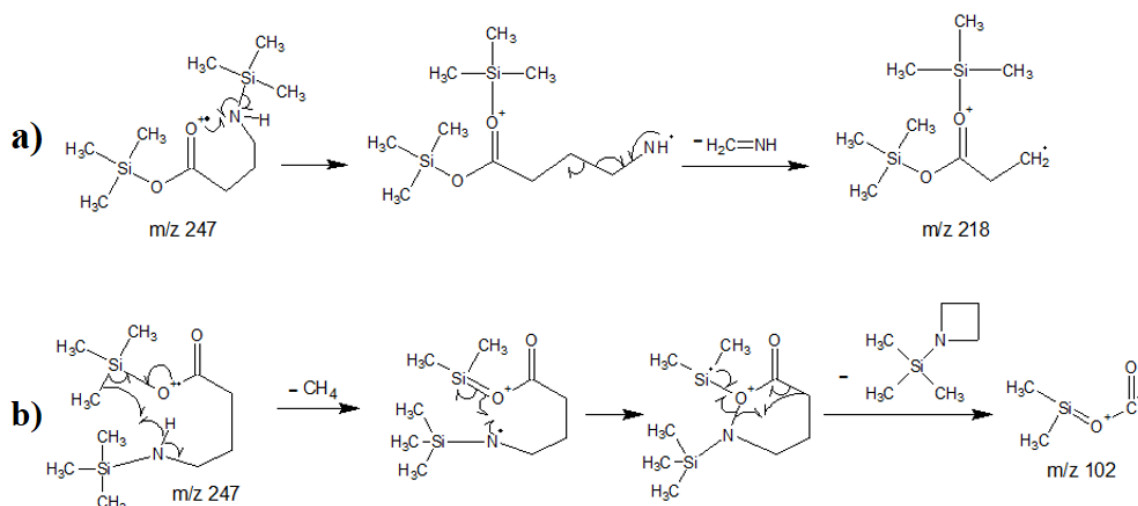


Figura 9 – Proposta de mecanismos de fragmentação para formação dos íões fragmento: m/z 218 (**Fig. 9a**) e a m/z 102 (**Fig. 9b**), a partir do íon molecular (m/z 247).

Como referido no início deste capítulo, o estudo das vias de fragmentação do GABA por EI tem relevância para a escolha do íon precursor e posterior escolha dos íões produto. Para a escolha do íon precursor é necessário ter em consideração diversos fatores, sendo um deles a razão m/z do íon, uma vez que a escolha de íões de elevada m/z permite aumentar a probabilidade de estes serem mais característicos do composto em estudo, aumentando, desta forma, a especificidade para esse mesmo composto (51,98); outro fator é a abundância relativa do íon, sendo esta tanto maior quanto maior a estabilidade dos íões (90). Com base nestes critérios e também com base no estudo realizado, optou-se pelo íon m/z 232 como íon precursor, uma vez que este é o íon do espectro GC-EI/MS do GABA di-TMS (**Fig. 6**) com, simultaneamente, razão massa/carga e abundância relativa elevadas e, segundo o mecanismo proposto na **figura 7**, é o íon $[\text{M}-15]^+$ sendo, assim, representativo do composto.

Após escolha do íon precursor a m/z 232, procedeu-se à aquisição de espectros MS/MS dos produtos de fragmentação desse íon após colisão energética com o gás de colisão Árgon, ou seja, fragmentação por CID (do inglês, *collision induced dissociation*). Para tal, o primeiro quadrupolo é configurado para transmitir apenas o íon selecionado, a m/z 232, sofrendo posterior fragmentação por CID na célula de colisão. O terceiro quadrupolo efetua o varrimento em *full SCAN* na gama de m/z ($50 \rightarrow 232$), sendo possível obter o espectro MS/MS dos produtos de fragmentação do íon precursor selecionado. Procedeu-se então à

aquisição de espectros de massa GC-EI/MS/MS do íão precursor, a diferentes energias de colisão, 5, 10, 15 e 20 eV. Na **tabela 5** encontram-se representados os resultados obtidos para cada energia de colisão testada, nomeadamente os principais íões produto e a respetiva abundância relativa. Através da análise da **tabela 5**, optou-se pela energia de colisão 10 eV, uma vez que se verifica que é a esta energia que os íões produto apresentam, simultaneamente, maior abundância relativa e razão m/z de forma a, posteriormente, ser possível a seleção de íões produto o mais específicos possível para o GABA (98). Desta forma, tem-se, na **figura 10**, o espectro de massa GC-EI/MS/MS do íão m/z 232, obtido com a energia de colisão 10 eV, assim como as respetivas estruturas propostas para os íões produto originados pela fragmentação do íão precursor.

Tabela 5 – Iões produto e respectivas abundâncias relativas (%) resultantes da fragmentação CID do íon precursor, a m/z 232, com diferentes energias de colisão: 5, 10, 15 e 20 eV.

Energia de Colisão (eV)	Ião Produto (m/z)	Abundância Relativa (%)
5 eV	147	100
	142	54,8
	149	39,4
	216	11,1
10 eV	147	100
	216	56
	142	37,1
	149	22,3
15 eV	147	100
	149	31,2
	131	15,8
	216	15,2
20 eV	147	100
	149	34,4
	130	29,3
	142	10,6

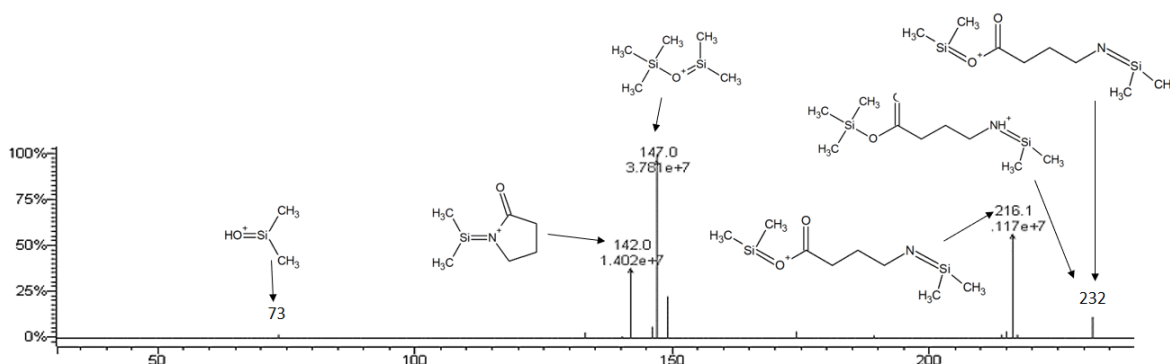


Figura 10 – Espectro de massa GC-EI/MS/MS do íon precursor, a m/z 232, do GABA di-TMS e respectiva representação das estruturas químicas propostas para os produtos de fragmentação por CID, a 10 eV.

Todos os íons presentes no espectro de massa GC-EI/MS/MS da **figura 10** resultam da fragmentação CID do íon precursor selecionado, a m/z 232. Pela análise do espectro de massa representado verifica-se a presença de íons produto a m/z 142 e a m/z 147. Apesar do mecanismo de fragmentação por CID e por EI não ser, necessariamente, o mesmo, neste estudo propõe-se que o mecanismo de fragmentação acima proposto do GABA por EI para

a formação dos íons fragmento a m/z 142 e a m/z 147, nas **figuras 8a e 8b**, respetivamente, será semelhante ao mecanismo de fragmentação CID do ião precursor, a m/z 232.

Na **figura 10** verifica-se, ainda, a presença de um ião produto a m/z 216, correspondente à perda de um fragmento neutro de 16 Da, a qual poderia ser associada à perda de um radical $\cdot\text{NH}_2$ ou à perda de um grupo CH_4 . Como a perda de um grupo CH_4 está descrita na literatura (89), considerou-se este como o mecanismo que deverá ocorrer para a formação do ião a m/z 216, tal como demonstrado na **figura 11**.

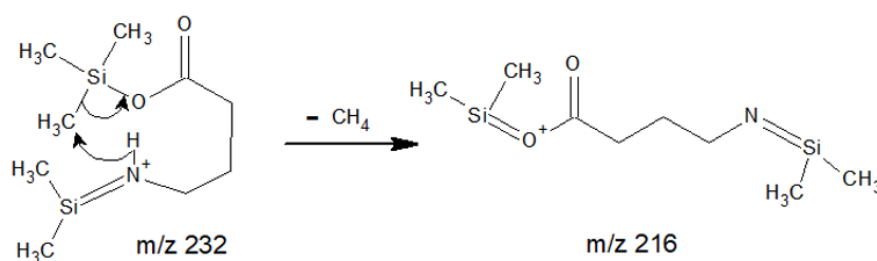


Figura 11 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a formação do ião produto, a m/z 216, a partir da fragmentação CID do ião precursor, a m/z 232.

Após análise dos produtos de fragmentação CID do ião precursor escolhido, a m/z 232, é necessário escolher quais dos íons produto serão utilizados como íons de quantificação e de diagnóstico. O ião de quantificação é o ião a que se recorre para a quantificação do composto e o ião diagnóstico é utilizado para confirmação qualitativa. Esta escolha tem como objetivo a posterior aquisição de espectros de massa em modo «monitorização de reações múltiplas», MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*). Neste modo, seleciona-se no primeiro quadrupolo o ião precursor, neste caso a m/z 232, sendo que no terceiro quadrupolo se selecionam os íons de quantificação e diagnóstico escolhidos. O modo MRM permite aumentar a sensibilidade/especificidade, uma vez que possibilita a supressão quase total da interferência de fundo (50). Desta forma, recorrendo aos mesmos critérios acima descritos para a escolha do ião precursor, como ião de quantificação sugere-se o ião m/z 216, uma vez que se trata do ião correspondente ao pico com simultâneas m/z e abundância elevadas (**Fig. 10**). Como ião diagnóstico poderia optar-se pelo ião a m/z 147.

Após estudo dos mecanismos de fragmentação mais prováveis e consequente escolha dos iões precursor, de quantificação e diagnóstico apresenta-se, na **figura 12**, um resumo da proposta do processo geral dessa mesma fragmentação, constituído pelos iões considerados mais relevantes.

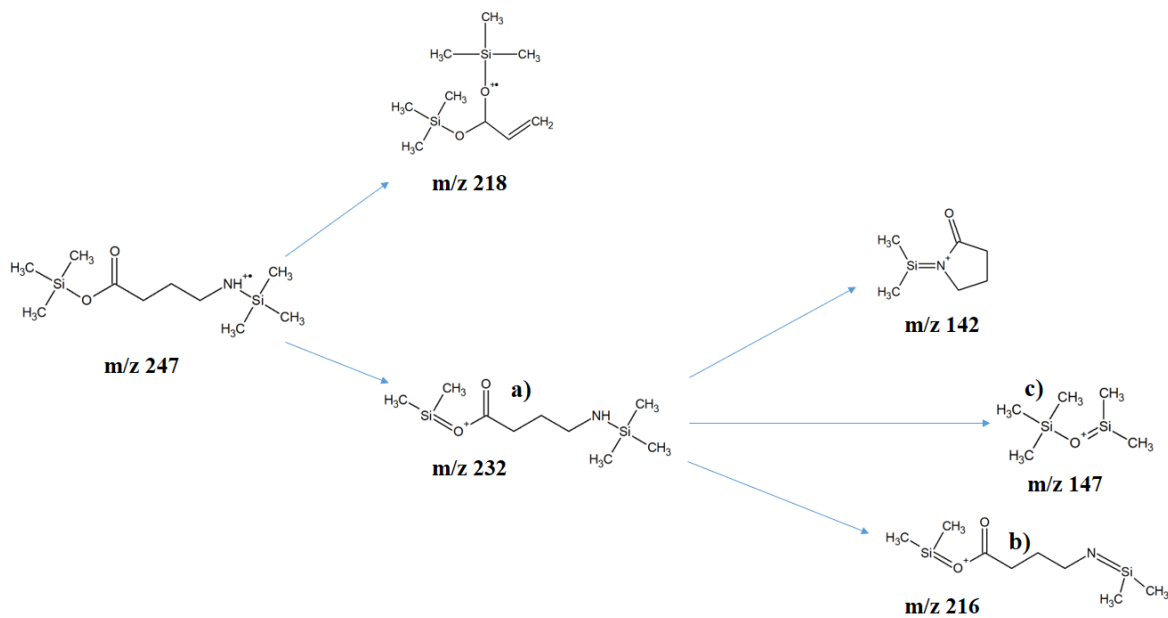


Figura 12 – Proposta do processo geral de fragmentação do GABA di-TMS partindo do ião molecular a m/z 247. Encontra-se representado em **a)** o ião precursor selecionado (m/z 232), em **b)** o ião produto de quantificação (m/z 216) e em **c)** o ião produto diagnóstico (m/z 147).

3.1.3- Estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC

Com base na mesma metodologia acima descrita para o GABA procede-se, neste capítulo, ao estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC. Assim, para o estudo do mecanismo de fragmentação do GHB-GLUC, inicialmente obtiveram-se os espectros de massa GC-EI/MS do derivado sililado do GHB-GLUC e do derivado sililado do GHB-GLUC-D₄, apresentados nas **figuras 13** e **14**, respectivamente, com a representação das estruturas químicas propostas para cada um dos íons fragmento visíveis no espectro.

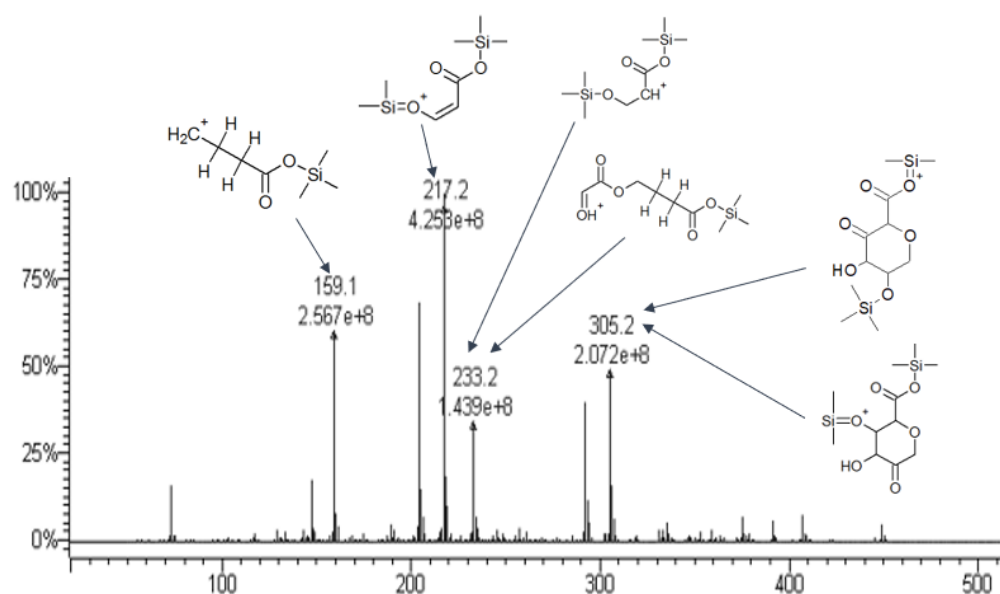


Figura 13 – Espectro de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→660) do derivado sililado do GHB-GLUC com as estruturas químicas propostas dos fragmentos representados.

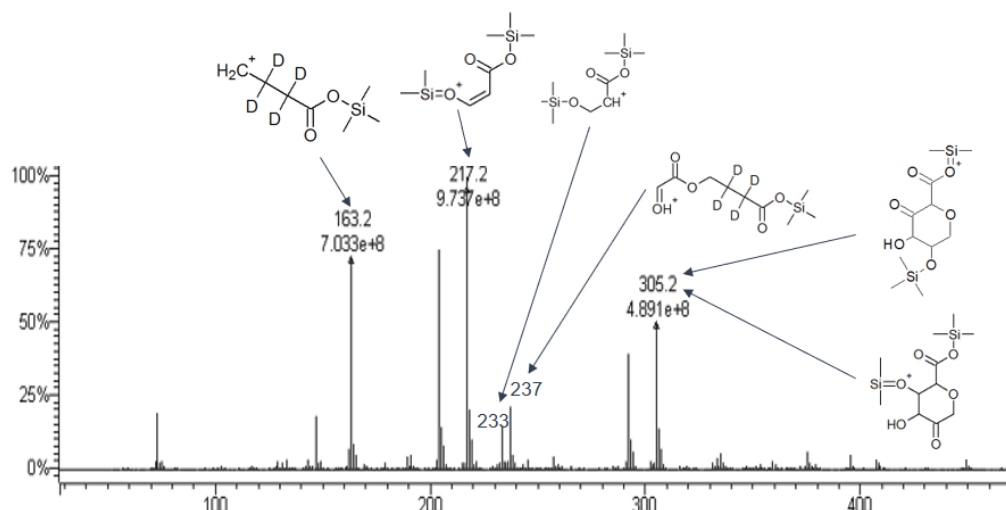


Figura 14 – Espectro de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* na gama m/z (50→660) do derivado sililado do GHB-GLUC-D₄ com as estruturas químicas propostas dos fragmentos representados.

Como anteriormente referido, pela análise do espectro de massa GC-EI/MS do GHB-GLUC não é possível verificar a presença do ião molecular ($[M]^{+}$) do GHB-GLUC sililado, contrariamente ao GABA. Apesar da ausência do ião $[M]^{+}$ do GHB-GLUC dificultar o estudo do mecanismo de fragmentação deste composto, a disponibilidade do análogo deuterado, GHB-GLUC-D₄, é uma mais-valia neste estudo.

Neste caso, a presença de iões fragmento com mais quatro unidades Da no espectro de massa GC-EI/MS do GHB-GLUC-D₄ (**Fig. 14**), comparativamente ao espectro de massa do GHB-GLUC (**Fig. 13**), indica que esses fragmentos incluem a parte do composto correspondente ao GHB, que contém os átomos de deutério (D). Pela análise dos espectros acima representados é possível identificar os referidos iões fragmento, nomeadamente a m/z 233 e a m/z 159 no espectro de massa do GHB-GLUC (**Fig. 13**), correspondentes aos iões fragmento a m/z 237 e a m/z 163 no espectro de massa do GHB-GLUC-D₄, respetivamente (**Fig. 14**). Relativamente ao ião fragmento do GHB-GLUC a m/z 159 (correspondente ao ião fragmento a m/z 163 do GHB-GLUC-D₄), este poderá corresponder ao carbocátion monosililado representado na **figura 15a**, resultante da quebra da ligação (C-O), com eliminação do ácido glucurónico sililado, na forma radicalar. O ião fragmento do GHB-GLUC a m/z 233 (correspondente ao ião a m/z 237 do GHB-GLUC-D₄) poderá corresponder ao catião monosililado representado na **figura 15b**, resultante da eliminação do radical

$[C_{10}H_{23}O_4Si_2]^+$. Desta forma, pode-se deduzir que a parte do composto GHB-GLUC correspondente ao GHB terá um grupo TMS.

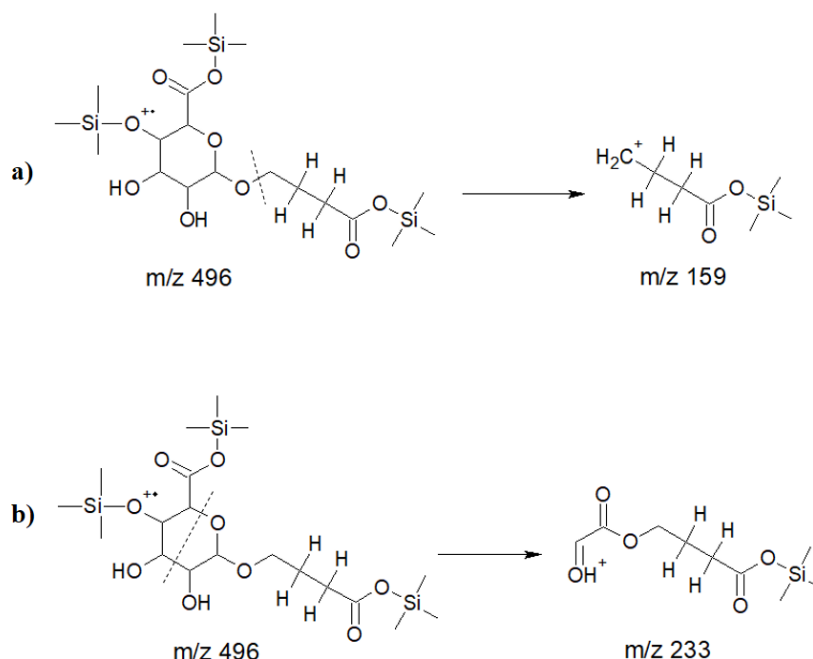


Figura 15 – Proposta de vias de fragmentação para a formação dos íons fragmento a m/z 159 (**Fig. 15a**) e a m/z 305 (**Fig. 15b**), a partir da fragmentação EI do ião molecular do GHB-GLUC tri-TMS, a m/z 496.

Realizando o mesmo raciocínio utilizado anteriormente, a presença de íons fragmento a igual m/z em ambos os espectros de massa GC-EI/MS do GHB-GLUC (**Fig. 13**) e do GHB-GLUC-D₄ (**Fig. 14**), indica que esses fragmentos têm origem na parte do ácido glucurônico do composto. Estes íons fragmento incluem os íons a m/z 305, a m/z 233 e a m/z 217, cujas estruturas propostas estão representadas na **figura 16**. Relativamente ao ião fragmento a m/z 305, este poderá corresponder ao ião equivalente ao ácido glucurônico dissililado, representado na **figura 16a**. Para a formação deste fragmento, a m/z 305, propõe-se a eliminação de um fragmento neutro correspondente ao GHB mono-TMS e, também, a eliminação de um radical metil ($\cdot CH_3$) ligado ao Si (93,94), tal como representado na **figura 16a**. Neste ponto, com base nas estruturas químicas propostas para cada um dos fragmentos já discutidos, é possível sugerir que o ião molecular mais provável do GHB-GLUC será o GHB-GLUC-tri-TMS (2 grupos TMS ligados na parte da molécula correspondente ao ácido glucurônico + 1 grupo TMS na parte correspondente ao GHB), a m/z 496.

Partindo do ião molecular do GHB-GLUC, a m/z 496, para a formação do ião fragmento a m/z 233 comum aos dois espectros de GHB-GLUC e de GHB-GLUC-D₄, propõe-se a quebra da estrutura cíclica do ácido glucurônico, rearranjo e consequente eliminação do radical $[C_{10}H_{19}O_6Si]^{\cdot}$, tal como indicado na **figura 16b**. Quanto ao ião fragmento a m/z 217, também este comum aos dois espectros de GHB-GLUC e de GHB-GLUC-D₄, sugere-se a sua formação a partir do ião fragmento a m/z 233, por eliminação de um fragmento neutro de CH₄, descrita na literatura (89), com a formação de uma ligação dupla, como se verifica na **figura 16b**.

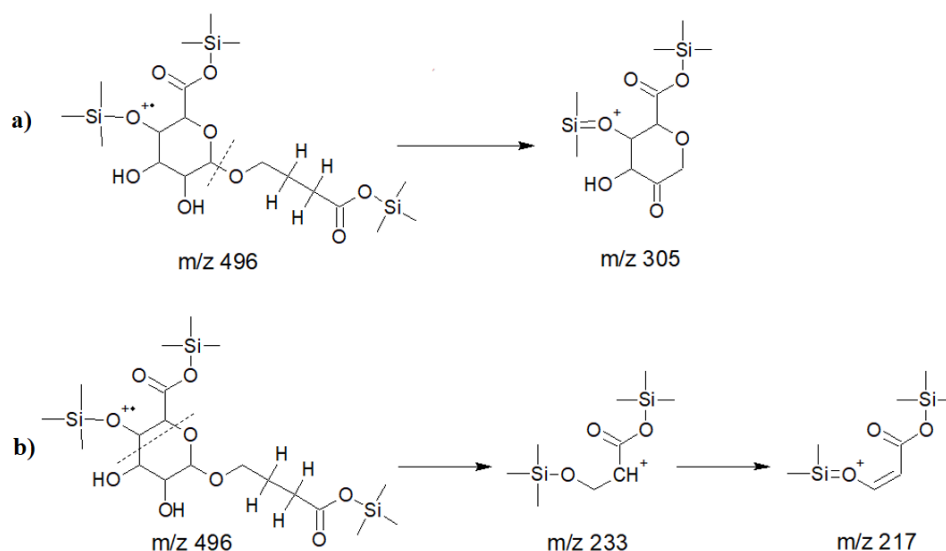


Figura 16 – Proposta de vias de fragmentação para a formação dos iões fragmento comuns aos espectros de massa do GHB-GLUC e do GHB-GLUC-D₄, a m/z 305 (**Fig. 16a**), a m/z 233 (**Fig. 16b**) e a m/z 217 (**Fig. 16b**), a partir da fragmentação EI do ião molecular do GHB-GLUC tri-TMS, a m/z 496.

Com base no estudo das vias de fragmentação do GHB-GLUC por EI apresentado, segue-se a escolha do ião precursor e posterior escolha dos iões produto. Para tal, apresentam-se, de seguida, duas alternativas de iões de quantificação e de diagnóstico, com o respetivo estudo da via de fragmentação por CID. Na primeira alternativa, apresentada no subcapítulo 3.1.3.1, o ião precursor escolhido foi o ião não comum ao espectro de massa GC-EI/MS do GHB-GLUC-D₄ com maior razão massa/carga e abundância relativa, ou seja, o ião fragmento a m/z 233, correspondente ao ião fragmento a m/z 237 do GHB-GLUC-D₄.

No entanto, sabendo que, até ao momento, o GHB-GLUC-D₄ não é comercializado, este não poderia ser utilizado na rotina do laboratório do Serviço de Química e Toxicologia Forense como padrão interno. Consequentemente, para efeitos de quantificação/confirmação da presença de GHB-GLUC em amostras biológicas será utilizado, como padrão interno, o GHB-D₆. Assim, na segunda alternativa, apresentada no subcapítulo **3.1.3.2**, o ião precursor escolhido foi o ião do espectro de massa GC-EI/MS do GHB-GLUC com, simultaneamente, razão massa/carga e abundância relativa elevadas, ou seja, o ião fragmento a m/z 305.

3.1.3.1- Estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC com o ião precursor a m/z 233

Como acima descrito, nesta secção, para o estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC optou-se pelo ião precursor a m/z 233, correspondente ao ião a m/z 237 do GHB-GLUC-D₄, uma vez que se trata do ião não comum com maior m/z e abundância relativa. Após seleção do ião precursor a m/z 233, procedeu-se à aquisição do espectro MS/MS e análise dos produtos de fragmentação desse ião após colisão energética com o gás de colisão. À semelhança do procedimento realizado para o GABA, configurou-se o primeiro quadrupolo para transmitir apenas o ião precursor, neste caso a m/z 233, sofrendo posterior colisão CID, com o terceiro quadrupolo a efetuar o varrimento em *full SCAN* na gama de m/z (50→233). Para o GHB-GLUC-D₄, configurou-se o primeiro quadrupolo para transmitir o ião a m/z 237 e o terceiro a efetuar varrimento em *full SCAN* na gama de m/z (50→237). Na obtenção dos espectros de massa GC-EI/MS/MS do ião precursor a m/z 233 experimentaram-se diferentes energias de colisão, a 5, 10, 15 e 20 eV. Na **tabela 6**, apresentam-se os principais iões produto e a respetiva abundância relativa. Pela análise dos resultados obtidos optou-se pela energia de colisão de 10 eV, uma vez que se trata da energia que permite a fragmentação do ião precursor em iões produto com maior m/z e com abundâncias relativas elevadas.

Tabela 6 – Iões produto e respectivas abundâncias relativas (%) resultantes da fragmentação CID do íon precursor, a m/z 233, com diferentes energias de colisão: 5, 10, 15 e 20 eV.

Energia de Colisão (eV)	Ião Produto (m/z)	Abundância Relativa (%)
5 eV	147	100
	143	92,7
	232	64,8
	142	49,6
10 eV	147	100
	143	66,1
	145	63,3
	148	60,4
15 eV	146	100
	72	83,3
	145	78,8
	73	66,9
20 eV	72	100
	73	72,7
	146	52,9
	148	27,7

Apresentam-se, assim, na **figura 17** os espectros de massa GC-EI/MS/MS do íon m/z 233 do GHB-GLUC (**Fig. 17a**) e do íon a m/z 237 do GHB-GLUC-D₄ (**Fig. 17b**), com a energia de colisão seleccionada, assim como as respectivas estruturas propostas para os iões produto, originados pela fragmentação dos iões precursores.

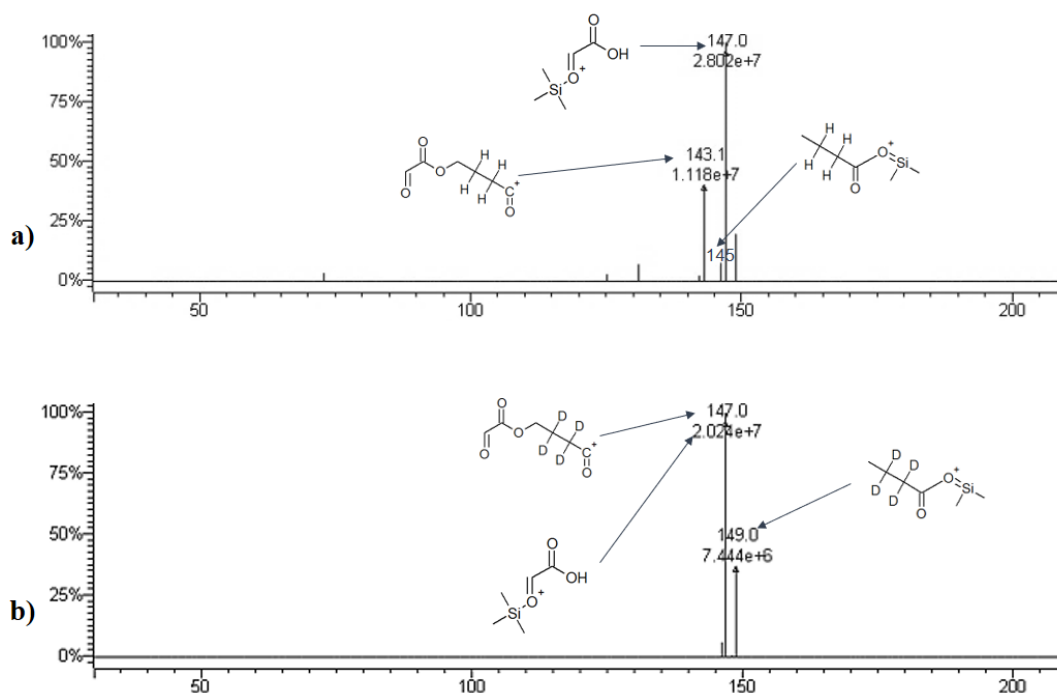


Figura 18 – Espectro de massa GC-EI/MS/MS do ião precursor a m/z 233, no caso do GHB-GLUC (**Fig. 18a**) e do ião precursor a m/z 237, no caso do GHB-GLUC-D₄ (**Fig. 18b**), e as respectivas representações das estruturas químicas propostas para os produtos de fragmentação por CID, a 10 eV.

Pela análise dos espectros de massa GC-EI/MSMS da **figura 17** verifica-se a presença de íons produto a m/z 147 tanto no espectro do GHB-GLUC (**Fig. 17a**) como no do GHB-GLUC-D₄ (**Fig. 17b**). Como descrito acima, é comum nos derivados de TMS a presença de um pico a m/z 147, correspondente ao fragmento apresentado na **figura 8b**, nomeadamente em compostos com mais do que um grupo trimetiloilo (91,93,95,96). No entanto, como o ião precursor escolhido para o GHB-GLUC(/D₄), a m/z 233(/237), representado na **figura 16b**, tem apenas um grupo trimetiloilo, sem a presença de mais nenhum grupo TMS, não é possível a formação desse fragmento a m/z 147 característico (**Fig. 8b**). Desta forma, a formação do ião produto a m/z 147 do GHB-GLUC, representado na **figura 18a**, envolve a migração do grupo TMS da parte do composto correspondente ao GHB para o grupo hidroxilo da parte correspondente ao ácido glucurónico (97), com consequente eliminação do radical $[C_4H_5O_2]^{\cdot}$.

Relativamente ao ião produto a m/z 145(/149) do GHB-GLUC(/D₄), representado na **figura 18b**, propõe-se a sua formação a partir da eliminação de um radical metil ligado ao

Si (93,94), bem como a eliminação do radical $[C_2HO_3]^{\cdot}$. No espectro de massa GC-EI/MS/MS do ião precursor do GHB-GLUC (**Fig. 17a**) verifica-se, ainda, a presença de um ião produto a m/z 143 que tem, como correspondente deuterado o ião a m/z 147 do espectro de massa do GHB-GLUC-D₄ (**Fig. 17b**). Ou seja, o pico a m/z 147 no espectro da **figura 17b** corresponde a dois fragmentos diferentes, o fragmento acima discutido, representado na **figura 18a**, assim como o correspondente deuterado ao fragmento a m/z 143 do GHB-GLUC, representado na **figura 18c**. Para a formação deste ião produto, a m/z 143 verifica-se um diferença de 90 Da, comparativamente ao ião precursor do GHB-GLUC, a m/z 233, o que indica que, provavelmente, ocorrerá a eliminação do grupo TMSOH (93).

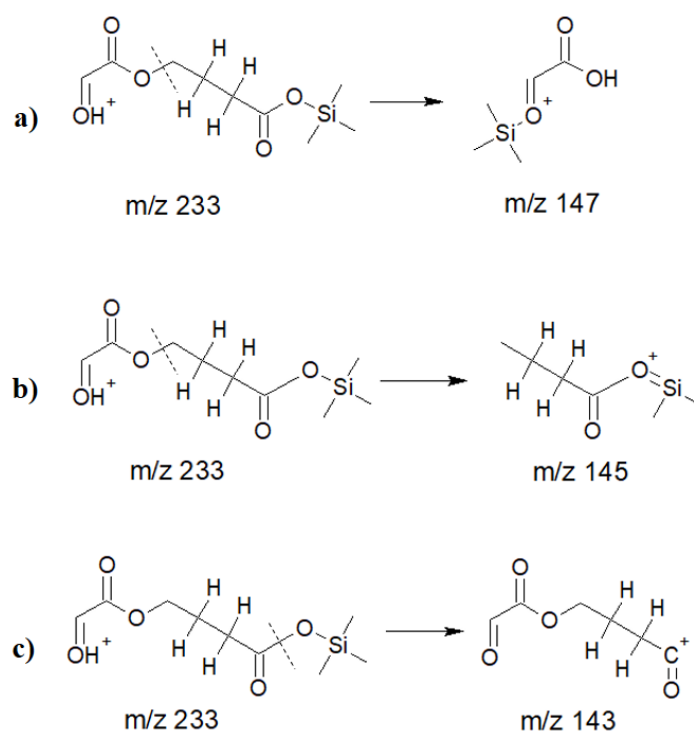


Figura 18 – Proposta de vias de fragmentação para a formação dos iões produto, a m/z 147 (**Fig. 18a**), a m/z 145 (**Fig. 18b**) e a m/z 143 (**Fig. 18c**), a partir da fragmentação CID do ião precursor do GHB-GLUC, a m/z 233.

Segue-se a escolha dos iões de quantificação e de diagnóstico para posterior aquisição de espectros de massa GC-EI/MS/MS em modo MRM, para determinação e

quantificação de GHB-GLUC em amostras biológicas. Seguindo os mesmos critérios descritos para o GABA, escolheu-se o ião a m/z 147 do GHB-GLUC como ião de quantificação. Como ião diagnóstico poderia optar-se por qualquer um dos iões produto, a m/z 145 e a m/z 143.

3.1.3.2- Estudo da via de fragmentação do GHB-GLUC com o ião precursor a m/z 305

Neste subcapítulo é abordada uma outra alternativa que, neste trabalho, será a escolhida para posterior determinação e quantificação do GHB-GLUC uma vez que, até ao momento, o padrão analítico GHB-GLUC-D₄ não é comercializado. Assim, contrariamente ao subcapítulo anterior, em que a escolha do ião precursor teve em consideração o facto de se recorrer ao GHB-GLUC-D₄, neste caso, optou-se pelo ião fragmento a m/z 305. Tal, deve-se ao facto de este ser um ião com, simultaneamente, razão m/z e abundância relativa elevadas, observadas no espectro de massa GC/EI-MS em modo *full SCAN* do GHB-GLUC representado na **figura 13**.

À semelhança do procedimento efetuado para o GABA e para o GHB-GLUC (ião precursor a m/z 233), procedeu-se à aquisição de espectros MS/MS dos produtos de fragmentação do ião a m/z 305 após colisão por CID, com o primeiro quadrupolo configurado para isolar apenas o ião a m/z 305 e o terceiro quadrupolo a efetuar o varrimento em *full SCAN* na gama de m/z (50 → 305). Para a obtenção de espectros GC-EI/MS/MS, no modo de aquisição descrito, experimentaram-se diferentes energias de colisão, 5, 10, 15 e 20 eV estando, na **tabela 7**, os principais iões produto e respetivas abundâncias relativas (%), para cada uma das energias de colisão.

Tabela 7 – Iões produto e respectivas abundâncias relativas (%) resultantes da fragmentação CID do íon precursor, a m/z 305, com diferentes energias de colisão: 5, 10, 15 e 20 eV.

Energia de Colisão (eV)	Ião Produto (m/z)	Abundância Relativa (%)
5 eV	143	100,0
	305	44,1
	73	43,2
	147	22,9
10 eV	305	100,0
	143	75,5
	147	21,9
	304	17,0
15 eV	143	100,0
	305	44,0
	73	31,5
	72	20,5
20 eV	73	100,0
	143	85,0
	147	30,7
	221	15,0

Optou-se pela energia de colisão 20 eV, uma vez que se trata da energia de colisão que permite a obtenção de íões produto a maiores valores de razão m/z e com simultâneas abundâncias relativas elevadas. Na **figura 19** apresenta-se o espectro de massa GC-EI/MS/MS do íon precursor escolhido do GHB-GLUC, a m/z 305, com a energia de colisão selecionada, assim como as respectivas estruturas propostas para os íões produtos.

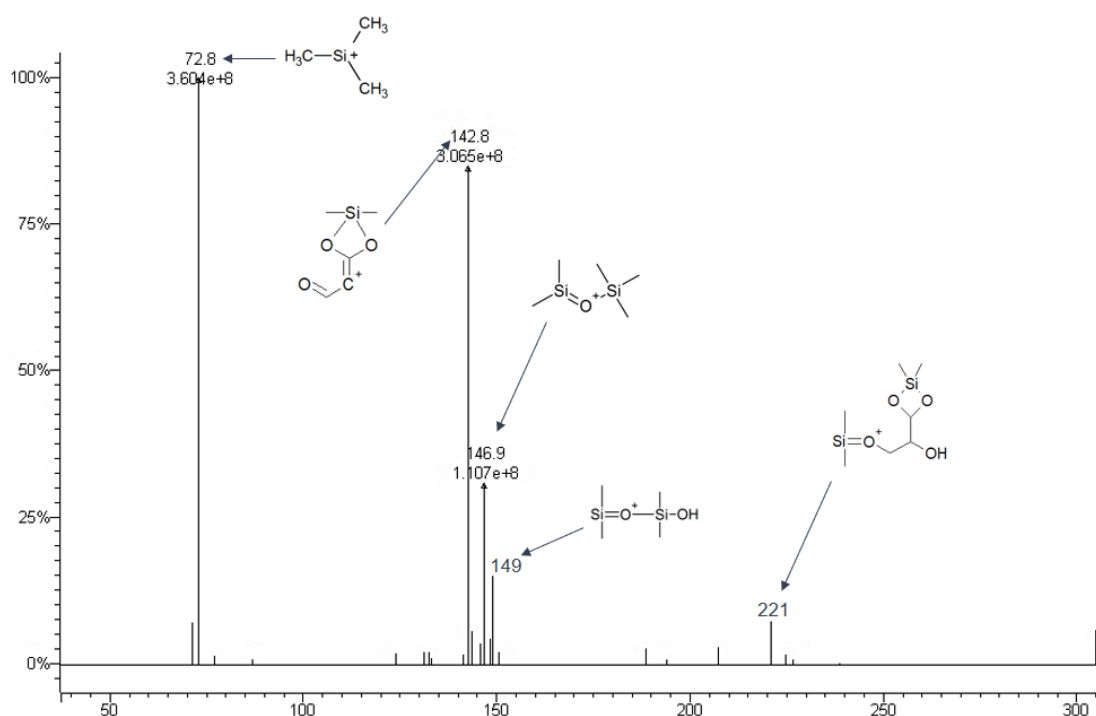


Figura 19 - Espetro de massa GC-EI/MS/MS do íon precursor a m/z 305, do GHB-GLUC, bem como as respectivas representações das estruturas químicas propostas para os produtos de fragmentação por CID, a 20 eV.

Pela análise do espectro de massa análise obtido por GC-EI/MS/MS (**Fig. 19**), verifica-se a presença de íões produto a m/z 147 e a m/z 149, sendo que, como já referido, a presença destes íões está descrita na literatura (91,93,95,96) em derivados de TMS com, pelo menos dois grupos trimetiloilo. Para a formação do fragmento a m/z 147, propõe-se a migração do grupo TMS para o grupo $[\text{OSi}(\text{CH}_3)_2]^+$, com eliminação do ácido carboxílico representado na **figura 20a**. Para a formação do íon fragmento a m/z 149, propõe-se uma inicial migração do grupo trimetiloilo para o grupo $[-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2]$. De seguida, propõe-se a perda de um grupo metano, uma vez que esta é uma perda de 16 Da descrita na literatura (89), com consequente rearranjo da estrutura cíclica e eliminação do 3,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirano-6-carbaldeído (**Fig. 20b**).

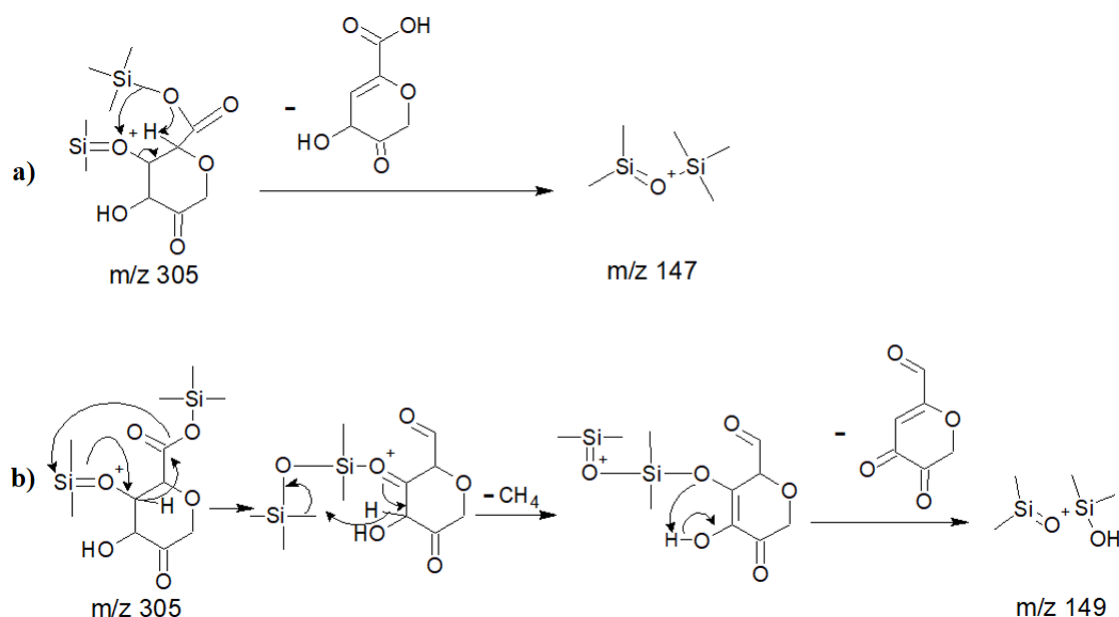


Figura 20 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a formação dos íões produto, a m/z 147 (**Fig. 20a**) e a m/z 149 (**Fig. 20b**), a partir da fragmentação CID do íon precursor do GHB-GLUC, a m/z 305.

É ainda visível no espectro de massa GC-EI/MS/MS do íon precursor do GHB-GLUC, a m/z 305 (**Fig. 19**), o fragmento a m/z 143 cujo mecanismo se encontra representado na **figura 21**. Para a formação do íon fragmento a m/z 143, sugere-se uma inicial eliminação neutra do grupo TMSOH, bem descrita na literatura (93), com consequente formação de uma estrutura cíclica com o grupo $[-\text{Si}(\text{CH}_3)_2]$. Com efeito, Potapov *et al.* (99) demonstraram, no estudo de compostos trimetilsililados, que a formação de estruturas cíclicas é frequentemente favorecida (99). Por último, propõe-se a eliminação neutra do grupo $[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]$ (**Fig. 21**).

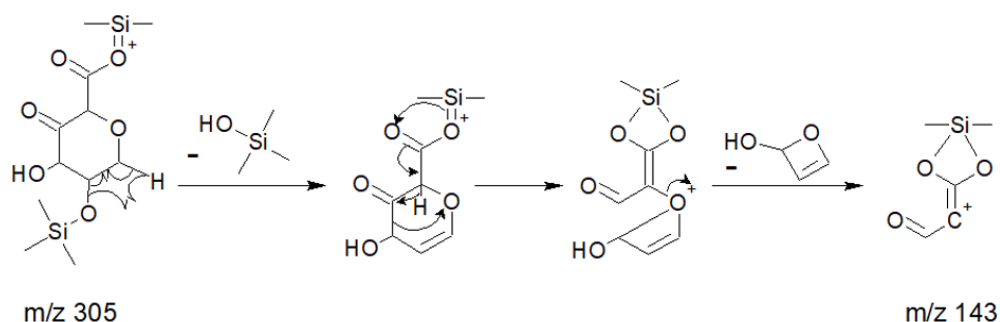


Figura 21 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a formação do íon produto, a m/z 143, a partir da fragmentação CID do íon precursor do GHB-GLUC, a m/z 305.

Com base no estudo apresentado, segue-se a escolha dos iões de quantificação e de diagnóstico. O ião fragmento a m/z 221 poderia ser uma boa opção para ião de quantificação, dado o seu elevado valor de m/z sendo, conseqüentemente, mais específico para o composto em estudo. No entanto, o ião fragmento a m/z 221 apresenta baixa abundância relativa. Assim, para ião de quantificação, optou-se pelo ião a m/z 143, uma vez que se trata do ião correspondente a um pico com simultâneas m/z e abundâncias elevadas. Como ião diagnóstico poderia optar-se pelo ião a m/z 147 ou a m/z 149, uma vez que, apesar de se tratarem de iões comuns em derivados de TMS (93,94), as eliminações neutras são características do composto em estudo.

Uma vez analisado as diferentes vias de fragmentação, apresenta-se, na **figura 22** encontra-se representada a proposta do processo geral de fragmentação do GHB-GLUC, constituído pelos iões que se consideraram mais relevantes anteriormente discutidos.

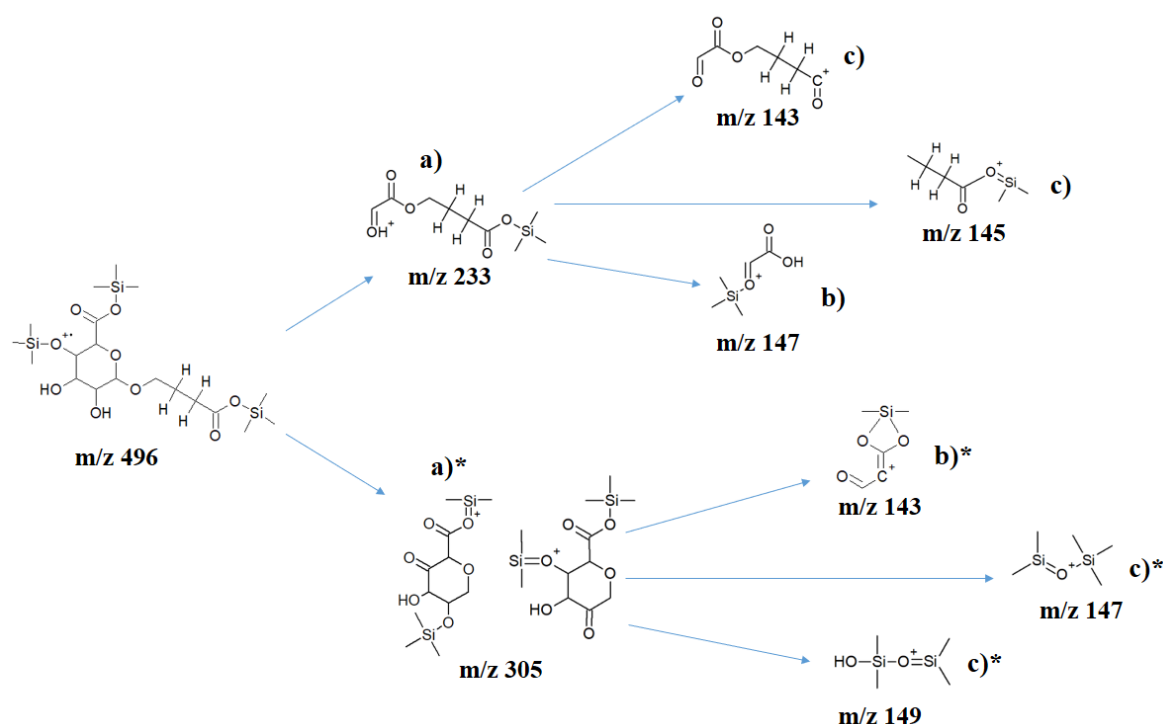


Figura 22 – Proposta do processo geral de fragmentação do GHB-GLUC, partindo do ião molecular a m/z 496. Encontra-se representado em **a)** o ião precursor selecionado a m/z 233 (correspondente ao ião precursor a m/z 237 do análogo deuterado, GHB-GLUC-D₄), em **b)** o ião de quantificação (m/z 147) e em **c)** os possíveis iões diagnóstico (m/z 143 e m/z 145). Em **a)*** encontra-se representado o ião precursor selecionado, a m/z 305 (na impossibilidade de se recorrer ao GHB-GLUC-D₄ como padrão interno), em **b)*** o ião de quantificação (m/z 143) e em **c)*** os possíveis iões diagnóstico (m/z 147 e m/z 149).

3.2- Validação do método analítico

Procede-se, nesta secção, à descrição dos resultados obtidos na validação do método analítico, com os iões selecionados descritos no estudo de fragmentação dos compostos-alvo. Desta forma, inicialmente, testaram-se diferentes procedimentos extrativos LLE, bem como um procedimento extrativo SPE. Após a seleção do procedimento extrativo mais adequado, seguiu-se a avaliação dos diferentes parâmetros de validação de um método analítico, seguindo os critérios definidos no SQTf-N (Serviço de Química e Toxicologia Forenses), sintetizados no **Anexo A**.

Durante os testes de pré-validação realizaram-se curvas de calibração de amostras controlo (água) fortificadas com os analitos GHB-GLUC e GABA. Um dos conjuntos de soluções preparado para a obtenção de uma curva de calibração foi injetado e, posteriormente, procedeu-se ao congelamento das mesmas a -20°C. Após cerca de 24 horas, as soluções foram reinjetadas, após descongelamento. Os resultados obtidos mostraram sinais analíticos de GHB-GLUC com intensidade semelhante em ambos os momentos, pré e pós-congelamento. Contudo, o mesmo não ocorreu com o GABA, uma vez que se verificou ausência total de sinais analíticos deste composto na reinjeção pós-congelamento, contrariamente à primeira injeção. Assim, verificou-se que o GABA apresenta instabilidade à congelação. Verificou-se ainda que o GABA não apresentou linearidade, nem na primeira injeção (resultados não apresentados), não sendo possível, neste caso, validar o método analítico para a quantificação de GABA.

Vários estudos demonstraram já a instabilidade do GABA no plasma (26) e em amostras de LCR (32). Tendo em consideração esta instabilidade, em Arashida *et al.* as amostras utilizadas para a quantificação de GABA foram tratadas sobre gelo e cada amostra foi utilizada apenas uma vez, de forma a evitar a decomposição (26). Noutro estudo, verificou-se um aumento significativo da concentração de GABA em amostras mantidas à temperatura ambiente até congelar, comparativamente às amostras congeladas imediatamente após a recolha ou mantidas em banho de gelo após recolha até congelar (32). No estudo citado, bastaram 30 minutos à temperatura ambiente até congelar para se verificar o aumento significativo das concentrações de GABA. No presente estudo, as amostras recolhidas não foram congeladas imediatamente nem colocadas em banho de gelo até congelar, o que poderá justificar o comportamento instável e não linear do GABA em

amostras reais. No entanto, neste trabalho, também se verificou instabilidade em soluções padrão de GABA, em concordância com a literatura, em que se verificou instabilidade de soluções de GABA, após 1 dia à temperatura ambiente (20°C), assim como após 7 dias congeladas (-20°C) (100).

3.2.1- Seleção do procedimento extrativo

Para a seleção do procedimento extrativo, testaram-se os diferentes procedimentos descritos no capítulo material e métodos. Quanto ao procedimento extrativo em fase sólida (SPE), optou-se por se adaptar o protocolo descrito por Richard *et al.* (67), dado que se trata do único método na literatura consultada no qual se extraem, simultaneamente, o GHB, um metabolito do GHB (a GBL) e o GABA, que vai ao encontro do objetivo ambicionado no presente trabalho. No entanto, após o procedimento de secagem no evaporador rotativo verificou-se a presença de resíduos no fundo dos tubos de vidro. Após o procedimento de derivatização verificou-se que, na maioria dos tubos, os resíduos referidos absorveram os extratos que seriam transferidos para *vials* para posterior análise analítica. Assim, pode-se concluir que a extração SPE não foi uma opção viável. Excluiu-se, também, a hipótese de se realizar o procedimento LLE adaptado de Wang *et al.* (70), uma vez que o sinal analítico do próprio padrão interno não é definido.

Relativamente ao procedimento LLE testado com o solvente acetato de etilo, verificou-se que, em amostras de sangue fortificado, o sinal da transição 305 → 143 do GHB-GLUC não se encontra definido, apresentando interferências, como se verifica no espectro GC-EI/MS/MS da transição 305 → 143 do GHB-GLUC, apresentado na **figura 23**.

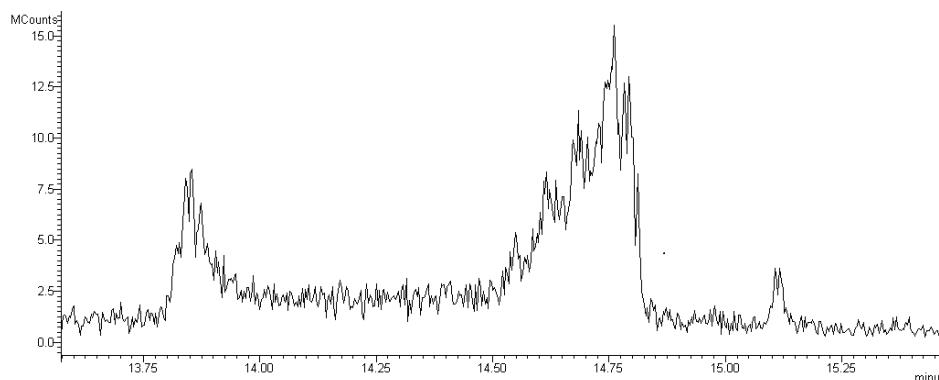


Figura 23 – Espectro GC- EI/MS/MS da transição $305 \rightarrow 143$ do GHB-GLUC, numa amostra de controlo de sangue fortificado, após extração LLE com acetato de etilo.

No que diz respeito aos procedimentos extrativos testados com os solventes metanol e acetonitrilo, verificaram-se resultados bastante semelhantes em ambos os procedimentos (resultados não apresentados). Assim, perante os resultados, optou-se pela utilização do metanol como solvente de extração, por motivos eminentemente práticos, nomeadamente o seu baixo custo e a sua maior disponibilidade no laboratório do SQTf-N.

3.2.2- Especificidade/Seletividade

Para a avaliação da especificidade foram preparadas cinco alíquotas de amostras controlo negativo (água), ou seja, não fortificadas, nem com analito nem com o padrão interno (PI) e, ainda, cinco alíquotas de amostras fortificadas com 1000 ng/mL de GHB-GLUC. Após aplicação do procedimento analítico, foi possível obter os sinais analíticos apresentados na **tabela 8**, nomeadamente as áreas, os tempos de retenção absoluto e relativo das amostras fortificadas com o analito de interesse.

Tabela 8 – Sinais analíticos obtidos nos testes de especificidade e seletividade para amostras controle (água) fortificadas com GHB-GLUC, nomeadamente as áreas absolutas e relativas e os tempos de retenção. Apresenta-se conforme se a área e o tempo de retenção relativos se encontram no intervalo de tolerância, ou seja, 21,1-31,7% e 1,1540-1,571, respetivamente.

	Composto	Transição	A absoluta	A relativa Tolerância		t.r.	t.r.r. Tolerância	
Controlo	GHB-GLUC	305 > 143	16216743	100,0%	20% (21,1% - 31,7)	14,16	1,556	1% (1,540 - 1,571)
		305 > 149	4283445	26,4%				
Amostra 1	GHB-GLUC	305 > 143	23824260	100,0%	Conforme	14,16	1,555	Conforme
		305 > 149	6460614	25,0%				
Amostra 2	GHB-GLUC	305 > 143	4062247	100,0%	Conforme	14,16	1,556	Conforme
		305 > 149	943111	23,2%				
Amostra 3	GHB-GLUC	305 > 143	10297266	100,0%	Conforme	14,16	1,554	Conforme
		305 > 149	2568919	24,9%				
Amostra 4	GHB-GLUC	305 > 143	23437770	100,0%	Conforme	14,16	1,554	Conforme
		305 > 149	6064879	25,9%				

Pela análise da **tabela 8** é possível verificar que as alíquotas fortificadas com o analito cumprem os critérios de aceitação de positividade, nomeadamente a área relativa não diferir mais do que 20% relativamente a um controlo e o tempo de retenção relativo não diferir mais do que 1% relativamente ao controlo. Outro critério de aceitação da positividade também avaliado foi o valor da razão sinal/ruído para o composto ser superior a 3.

Com a análise de amostras controlo negativo, sem adição de analito nem de padrão interno, verificou-se a ausência de picos que poderiam interferir com a deteção do analito em estudo ou do padrão interno. Amostras controlo com adição de padrão interno foram também analisadas, tendo-se verificado a ausência de interferentes para o analito no padrão interno; o mesmo se verificou pela análise de uma amostra de reagente de derivatização após o processo de derivatização.

Verificou-se, assim, a inexistência tanto de falsos positivos como de falsos negativos, não se tendo encontrado quaisquer interferentes. Pode-se evidenciar que o método é específico e seletivo para o GHB-GLUC, permitindo a identificação inequívoca do analito.

Estas conclusões são válidas quer para a vertente de confirmação qualitativa, quer para a vertente quantitativa.

3.2.3- Gama de trabalho, Linearidade e Modelo de Calibração

De forma a cumprir o objetivo estipulado, a validação de um método analítico para quantificação de GHB-GLUC para amostras correspondentes a casos de consumo exógeno de GHB e/ou em amostras *post-mortem* e, perante a inexistência de dados na literatura com a descrição de valores de concentração de GHB-GLUC, optou-se por se testar uma gama de trabalho extensa, que se situa entre os 200 ng/mL e os 5000 ng/mL. Com o estudo da gama de trabalho e da linearidade procura-se avaliar se existe proporcionalidade direta entre os sinais analíticos e as concentrações utilizadas na gama escolhida (87).

Uma vez escolhida a gama de trabalho, seguiu-se a aplicação do “método dos mínimos quadrados” para estimar os parâmetros de um modelo por regressão linear simples. Neste, de acordo com os critérios internos do SQTF-N (**Anexo A**), é aceite um valor absoluto do coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 para um intervalo de confiança a 95%. Seguiu-se a realização do teste estatístico F para a verificação da homocedasticidade das variâncias entre o primeiro e o último níveis da curva de calibração, como proposto na norma ISO 8466-1 (101). Assim, para a avaliação da homocedasticidade preparou-se uma curva de calibração, tendo-se realizado cinco injeções de cada um dos níveis correspondentes aos extremos da gama, a 200 ng/mL e a 5000 ng/mL. Recorreu-se a um modelo de regressão linear simples para calcular as concentrações obtidas para cada nível de concentração em cada réplica.

Os resultados obtidos para a avaliação da homocedasticidade, apresentados na **tabela 9**, permitem também avaliar a resposta do método, em termos quantitativos, nos limites da curva de calibração. Os valores calculados para o coeficiente de variação (CV), em valor percentual, para cada um dos limites superior e inferior, foram de 4,08% e 3,31%, respetivamente (**Tab. 9**). Como estes valores de CV foram inferiores a 10% podem ser dados como aceites, de acordo com o procedimento operacional para a validação de procedimentos de ensaio em vigor no SQTF-N (**Anexo A**).

Tabela 9 – Resultados obtidos no estudo da homocedasticidade das variâncias para o GHB-GLUC, bem como a respetiva média, desvio-padrão, variância e coeficiente de variação em valor percentual.

	[GHB-GLUC] (ng/mL)	
Nível	200	5000
Injeção 1	163,03	4978,34
Injeção 2	156,42	5052,63
Injeção 3	149,33	5111,65
Injeção 4	155,86	4730,62
Injeção 5	160,3	5290,58
Média	156,99	5032,76
Desvio-Padrão	5,19	204,53
Variância (S ²)	26,93	41834,93
CV (%)	3,31	4,06

Com os resultados obtidos (**Tab. 9**) calculou-se o valor de F (F calc.), segundo a **equação 1**, para posterior comparação com o valor tabelado da distribuição F de Fisher, o valor F crítico. Como se pode verificar na **tabela 10**, o valor de F calculado é superior ao valor de F crítico para 4 graus de liberdade no denominador e no numerador. Logo, as diferenças entre as variâncias são estatisticamente significativas, sendo o método considerado heterocedástico para a gama de trabalho proposta.

$$F_{calc.} = \frac{S_{superior}^2}{S_{inferior}^2} \quad \text{ou} \quad F_{calc.} = \frac{S_{inferior}^2}{S_{superior}^2}, \text{ tal que } PG \geq 1 \quad (\text{Equação 1})$$

Tabela 10 - Resultados do Estudo de Regressão para a Linearidade do GHB-GLUC, nomeadamente o teste estatístico F.

F calculado (S ² _{sup} /S ² _{inf})	1553,540296
F crítico	6,388
Conformidade do Teste	Não Conforme

Como a aplicação de um modelo de regressão linear simples implica a verificação da homocedasticidade dos dados (87), conclui-se que o modelo linear não poderá ser aplicado neste trabalho, apesar de se obter um coeficiente de correlação aceitável, ou seja, superior a 0,99 (102). A causa mais comum descrita para a heterocedasticidade dos dados é o aumento da variância em função da concentração (103). Em concordância, verifica-se, na **tabela 9**,

uma variância do nível de concentração 5000 ng/mL consideravelmente superior à variância do nível inferior, a 200 ng/mL. No presente trabalho seria expectável verificar-se heterocedasticidade dos dados, uma vez que a gama de trabalho ultrapassa uma ordem de grandeza (87,102).

Nestes casos, quando se verifica a heterocedasticidade de variâncias, sugere-se, segundo a literatura, a aplicação de fatores de ponderação (87). A aplicação de fatores de ponderação tem como princípio a atribuição de maior relevância aos pontos da curva com menor variância, por norma os pontos no limite inferior da gama de trabalho (e vice-versa) (102). O modelo de regressão ponderada é aplicado quando o coeficiente de variação é constante ao longo da gama, ou seja, o desvio-padrão aumenta proporcionalmente à concentração. Na **tabela 9** verifica-se que os coeficientes de variação nos limites inferior e superior são 3,31% e 4,06%, respetivamente. Como estes coeficientes de variação são bastante próximos, pode-se estimar que também o sejam ao longo da gama, sendo possível aplicar a regressão linear ponderada.

Para o estudo da regressão ponderada testaram-se seis fatores de ponderação aplicados aos dados obtidos de curvas de calibração na gama de trabalho definida. Alguns autores (103), sugerem que se deverá escolher o fator de ponderação que apresente menor valor de somatório dos erros relativos ($\Sigma \%RE$), que compara a concentração calculada com base na curva de calibração aplicando cada fator de ponderação ($C_{calculada}$), com a concentração teórica ($C_{teórica}$), segundo a **equação 2**.

$$\% RE = \frac{C_{calculada} - C_{teórica}}{C_{teórica}} \times 100 \quad (Equação 2)$$

Neste sentido, estudaram-se seis fatores de ponderação diferentes, $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^2$. Para cada um dos fatores citados analisaram-se os valores de parâmetros característicos da curva de calibração, como o valor do fator de correlação (r^2) e o somatório dos erros relativos ($\Sigma \%RE$), em valor percentual, apresentando-se os resultados na **tabela 11**.

Tabela 11 – Resultados do estudo da aplicação de fatores de ponderação para o GHB-GLUC, com base em diferentes curvas de calibração.

Fator de Ponderação	r^2	r^2	r^2	r^2	r^2	r^2	r^2 (média)	Σ %RE
	Precisão 1	Precisão 2	Precisão 3	Precisão 4	Precisão 5	Precisão 6		
1	0,994388	0,995893	0,999595	0,995868	0,997992	0,994541	0,9964	173,281
$1/x^{1/2}$	0,995299	0,997381	0,999453	0,997173	0,998792	0,99633	0,9974	123,764
$1/x$	0,995748	0,998159	0,999317	0,997596	0,999027	0,997128	0,9978	103,981
$1/x^2$	0,995543	0,998817	0,998992	0,997558	0,998911	0,996886	0,9978	88,927
$1/y^{1/2}$	0,995665	0,997557	0,999453	0,997311	0,998859	0,996461	0,9975	115,957
$1/y$	0,995744	0,998284	0,9993	0,99764	0,999076	0,997195	0,9979	97,606
$1/y^2$	0,992624	0,998817	0,998879	0,997571	0,99891	0,996633	0,9972	89,968

Pela análise dos resultados obtidos (**Tab. 11**), verificou-se que todos os fatores de ponderação em estudo apresentam um valor de r^2 superior a 0,99. Verificou-se, ainda, que o fator de ponderação 1 (modelo de regressão linear) origina um valor de somatório de %RE superior aos restantes modelos apresentados, o que seria expectável considerando a heterocedasticidade previamente confirmada. Pelo contrário, o fator $1/x^2$ é o que apresenta menor valor de somatório de %RE.

Apesar do somatório de %RE ser descrito e considerado um indicador útil e sensível para a avaliação da eficácia de um determinado fator de ponderação (103), existem autores (102) que recomendam, ainda, a inclusão de um estudo do comportamento de controlos de qualidade (CQ) independentes preparados contemporaneamente à curva de calibração em diferentes dias, nomeadamente a avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão (102).

No presente trabalho, adaptaram-se as abordagens descritas na literatura, tendo-se avaliado a precisão (limite de repetibilidade) e a exatidão (incerteza expandida) em cada um dos três níveis de CQs, a 1 000 ng/mL, 2 500 ng/mL e a 4 000 ng/mL. O cálculo dos valores de limite de repetibilidade e de incerteza expandida está descrito, nas secções **3.2.7** e **3.2.8**. Os dados foram obtidos com base em oito curvas de calibração (com os três níveis de CQs), realizadas em dias diferentes. Nas **tabelas 12** e **13** estão representados os resultados obtidos, para cada um dos níveis de CQ, dos limites de repetibilidade e da incerteza expandida,

respetivamente. Nas tabelas referidas apresenta-se ainda o parâmetro *ranking*, ou seja, a classificação atribuída a cada modelo de regressão, sendo esta tanto melhor quanto menor o valor do limite de repetibilidade/incerteza expandida.

Tabela 12 – Dados obtidos no estudo do limite de repetibilidade em cada um dos três níveis de controlo de qualidade, nos diferentes fatores de ponderação em estudo, bem como a classificação (*rank*) atribuída a cada um dos fatores.

Fator de Ponderação	Limite de repetibilidade					
	CQ1	Rank	CQ2	Rank	CQ3	Rank
$1/x^{1/2}$	18,37%	3	17,71%	5	13,70%	5
$1/x$	18,44%	5	17,70%	4	13,68%	3
$1/x^2$	18,16%	1	17,59%	2	15,56%	6
$1/y^{1/2}$	18,37%	3	17,71%	5	13,68%	3
$1/y$	18,35%	2	14,58%	1	13,66%	1
$1/y^2$	18,51%	6	17,67%	3	13,67%	2

Tabela 13 – Dados obtidos no estudo da incerteza expandida em cada um dos três níveis de controlo de qualidade, nos diferentes fatores de ponderação em estudo, bem como a classificação (*rank*) atribuída a cada um dos fatores.

Fator de Ponderação	Incerteza Expandida					
	CQ1	Rank	CQ2	Rank	CQ3	Rank
$1/x^{1/2}$	59,16%	6	29,89%	1	26,74%	1
$1/x$	54,87%	5	29,96%	2	27,19%	3
$1/x^2$	48,65%	1	32,16%	6	29,24%	5
$1/y^{1/2}$	51,94%	4	30,34%	3	26,85%	2
$1/y$	49,52%	3	32,09%	5	28,37%	4
$1/y^2$	49,42%	2	31,73%	4	29,54%	6

Com os dados obtidos foi possível realizar o somatório das classificações atribuídas a cada um dos fatores de ponderação nos parâmetros limite de repetibilidade (**Tab. 12**), incerteza expandida (**Tab. 13**) e, ainda, da soma da %RE (**Tab. 11**). Desta forma, realizou-se um *ranking* final, apresentado na **tabela 14**.

Tabela 14 – *Ranking* final dos diferentes fatores de ponderação com base na soma das classificações (*rank*) em cada um dos parâmetros em estudo, o limite de repetibilidade, a incerteza expandida e erro relativo.

Fator de Ponderação	Limite de repetibilidade	Incerteza Expandida	Erro Relativo	Σ Rank Final
	Σ Rank	Σ Rank	Σ Rank	
$1/x^{1/2}$	13	8	6	27
$1/x$	12	10	4	26
$1/x^2$	9	12	1	22
$1/y^{1/2}$	11	9	5	25
$1/y$	4	12	3	19
$1/y^2$	11	12	2	25

Na **tabela 14** é possível verificar que o fator de ponderação $1/y$ foi o que apresentou melhor posição final, comparativamente aos restantes fatores de ponderação em estudo. Como esta classificação tem como base diferentes parâmetros, um relacionado com a precisão, outro com a exatidão em três níveis de CQ, bem como a %RE de diferentes curvas de calibração, considerou-se que o fator de ponderação $1/y$ será o mais adequado para toda a gama de trabalho

3.2.4- Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

A determinação dos limites de deteção e de quantificação realizou-se a partir dos dados de curvas de calibração. Para o estudo do LOD recorreu-se a uma curva de calibração na zona do limite mais baixo da gama de trabalho, isto é, 200 ng/mL, sendo este o valor previsto para LOD. Procedeu-se, então, à fortificação de amostras brancas (água) com GHB-GLUC a fim de se obter uma curva de calibração entre os níveis 100 ng/mL e 300 ng/mL. Apesar de se ter concluído, na secção anterior, que a calibração ponderada seria a mais adequada, no estudo dos limites recorreu-se à regressão linear simples. Esta opção está relacionada com a importância acrescida das concentrações mais baixas na regressão linear ponderada, fazendo com que as concentrações mais elevadas sejam menosprezadas, nos parâmetros de dispersão determinados.

A curva de calibração obtida está representada na **figura 24** estando a totalidade dos resultados apresentada em **Anexo B1** e, na **tabela 15**, representados os dados da curva e,

também os valores de LOD e LOQ calculados a partir desses dados, com base nas seguintes equações:

$$LOD = \frac{3,3 S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 3})$$

$$LOQ = \frac{10 S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 4})$$

sendo b o declive da curva de calibração e $S_{y/x}$ o desvio padrão residual da curva de calibração.

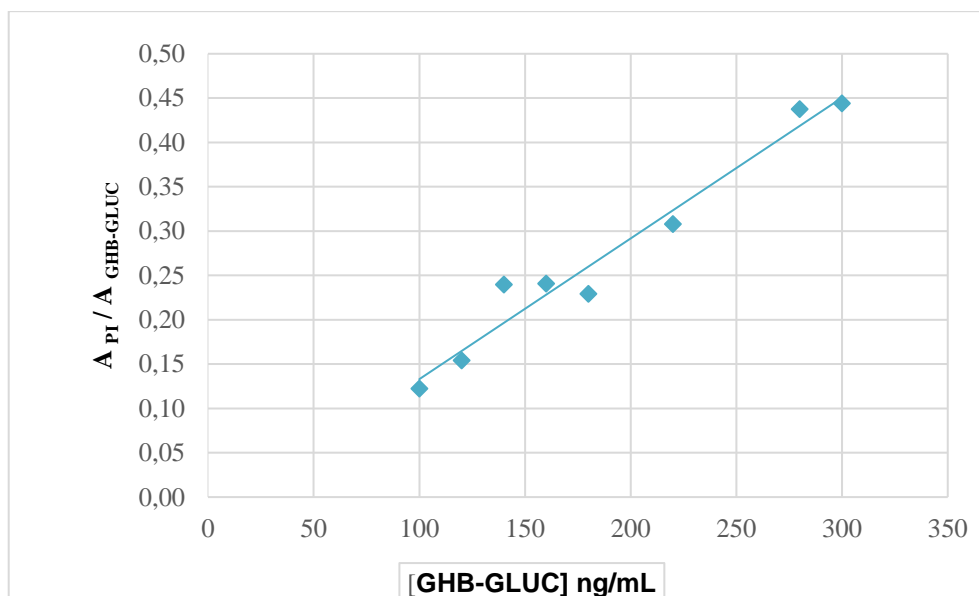


Figura 24 – Curva de calibração obtida para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação para o GHB-GLUC, aplicando regressão linear normal.

Tabela 15 – Dados da curva de calibração, tais como o declive, o desvio padrão residual, o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de correlação de Pearson (r^2). Estão ainda representados os limites de detecção e de quantificação calculados.

Declive (b)	0,0016	S_{y/x}	0,0253
r²	0,9609	r	0,9803
LOD (ng/mL)	52,65	LOQ (ng/mL)	159,56

Como apresentado na **tabela 15**, o coeficiente de correlação obtido é superior a 0,98 (como se estipulado nos critérios de aceitação), pelo que se calcularam os valores dos limites de detecção e de quantificação de 52,65 ng/mL e de 159,56 ng/mL, respetivamente. No entanto, o limite de quantificação pode ser estabelecido acima do mesmo determinado pelos dados da curva de calibração, desde que seja adequado à interpretação toxicológica dos resultados analíticos (87). Assim, pelos objetivos estipulados e acima apresentados da validação deste método analítico, definiu-se o LOQ como 200 ng/mL.

Pela análise da **tabela 3**, é possível verificar que os resultados obtidos de LOD e LOQ do presente método são consideravelmente inferiores aos valores destes mesmos limites obtidos nos trabalhos de Tittarelli *et al.* (61) e de Busardò *et al.* (25). Têm-se, como exceção, os trabalhos realizados por Petersen *et al.* (47), na quantificação do analito em urina, e de Mehling *et al.* (49), na quantificação de GHB-GLUC em plasma e urina. Uma vez que o objetivo inerente ao método analítico validado neste trabalho não é a quantificação de valores endógenos *in vivo* de GHB-GLUC, mas sim a quantificação deste metabolito em casos de intoxicação por GHB e em amostras *post-mortem*, os limites de detecção e de quantificação obtidos no presente trabalho consideram-se adequados ao propósito.

Prepararam-se, ainda, 5 réplicas independentes fortificadas à concentração definida como o limite de quantificação (LOQ), de forma a verificar que o coeficiente de variação destas mesmas réplicas seja inferior a 20%, como descrito no procedimento de validação de um método analítico, em vigor no SQTF-N. Os resultados das concentrações de GHB-GLUC apresentados na **tabela 16** foram calculados com base na curva de calibração por regressão linear não ponderada, preparada contemporaneamente à preparação das réplicas. O coeficiente de variação obtido (5,77%) foi inferior ao máximo aceitável, de 20%, cumprindo o critério de aceitação.

Tabela 16– Dados da concentração de GHB-GLUC calculada em ng/mL para cada uma das réplicas, bem como o respetivo coeficiente de variação (%) calculado.

	[GHB-GLUC] calculada
Réplica 1	265,05
Réplica 2	263,42
Réplica 3	274,47
Réplica 4	234,52
Réplica 5	261,28
Coeficiente de Variação (%)	5,77

3.2.5- Arrastamento

Para a avaliação do arrastamento prepararam-se quatro amostras brancas e o mesmo número de amostras fortificadas com o analito de interesse em concentração elevada (5000 ng/mL). Após aplicação do procedimento analítico procedeu-se à injeção no equipamento, de forma alternada, das amostras positivas e negativas. Os resultados demonstraram a inexistência de falsos positivos, evidenciando a ausência de fenómenos de arrastamento.

3.2.6- Rendimento da Extração

Para a avaliar a eficiência ou rendimento da extração prepararam-se doze amostras de sangue branco, seis das mesmas fortificadas antes do procedimento extrativo e outras seis amostras fortificadas após aplicação do procedimento extrativo. Em todas as doze amostras de sangue o padrão interno foi adicionado após o procedimento extrativo. Cada conjunto de seis amostras referido foi fortificado a dois níveis, um representativo da gama baixa da curva de calibração, a 500 ng/mL, e outro representativo da gama alta da curva, a 5000 ng/mL. Calculou-se o rendimento da extração com base na **equação 5**, estando os resultados obtidos representados na **tabela 17**.

$$\text{Rendimento da Extração (\%)} = \frac{\frac{A_{\text{analito prévio extração}}}{A_{\text{Padrão Interno}}}}{\frac{A_{\text{analito posterior extração}}}{A_{\text{Padrão Interno}}}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Tabela 17 – Resultados obtidos para o rendimento da extração em cada um dos níveis, a média por nível e, ainda, o rendimento médio de extração, em valor percentual.

Concentração (ng/mL)	Rendimento da Extração (%)	Média por nível (%)
Nível Baixo		
500	42,52	38,57
500	38,68	
500	34,51	
Nível Alto		
5000	70,83	62,63
5000	67,22	
5000	49,85	
Rendimento Médio de Extração (%)		50,60

O rendimento médio de extração obtido neste trabalho foi de 50,60%, sendo este valor abaixo dos valores de rendimento obtidos na literatura, como se verifica na **tabela 3**. No entanto, apesar do rendimento da extração ser inferior ao reportado nos métodos analíticos validados para a quantificação do GHB-GLUC, o método analítico validado no presente estudo apresentou limites de deteção e de quantificação aceitáveis para os objetivos inerentes ao trabalho.

3.2.7- Precisão

A avaliação da precisão foi realizada conjugando o cálculo da precisão intermédia, da repetibilidade e do limite de repetibilidade, através da análise de variâncias (ANOVA, do inglês *Analysis of Variances*). Analisaram-se dados obtidos para três níveis de CQ (1000, 2500 e 4000 ng/mL), um representativo da gama de concentração baixa, outro a meio da gama de trabalho e o terceiro representativo da gama de concentração elevada, tendo sido preparadas duas alíquotas por nível. Os controlos referidos foram preparados contemporaneamente com as curvas de calibração na gama de trabalho definida. Este procedimento foi repetido oito vezes, tendo sido contempladas diversas fontes de variabilidade, nomeadamente a utilização de diferentes pipetas, soluções de trabalho, reagentes e solventes. É, também, de salientar outra fonte de variabilidade associada à realização dos testes em dias diferentes, mimetizando a realidade na rotina laboratorial. No entanto, o operador foi sempre o mesmo.

Para a análise dos resultados aplicou-se o fator de ponderação $1/y$, escolhido anteriormente. Os resultados obtidos para as duas réplicas de um dia foram considerados um grupo, obtendo um total de oito grupos. Realizou-se, então, a análise ANOVA de fator único, tendo-se obtido os resultados dos quadrados médios residuais dos resultados dentro de grupos, MS_r , e dos quadrados médios dos resultados entre grupos, MS_{run} . Através dos resultados obtidos foi possível calcular as estimativas do desvio-padrão da repetibilidade, S_r , do desvio-padrão da precisão entre grupos, S_{run} e, também, do desvio-padrão da precisão intermédia S_1 , pelas **equações 6, 7 e 8**. Quanto ao limite de repetibilidade, para ensaios com mais de dois testes, como é o caso, este resulta da multiplicação do CV obtido por um fator de gama crítico, $f(n)$, dependente do número de réplicas, sendo este 2,8 para $n=2$.

$$S_r = \sqrt{MS_r} \quad (\text{Equação 6})$$

$$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}, \text{ sendo } n \text{ o número de réplicas} \quad (\text{Equação 7})$$

$$S_1 = \sqrt{S_r^2 - S_{run}^2} \quad (\text{Equação 8})$$

A totalidade dos resultados apresentam-se em **Anexo B**, que contempla os resultados de desvio-padrão da repetibilidade, do desvio-padrão da precisão entre grupos, do desvio-padrão da precisão intermédia, a média do coeficiente de variação e, também, o limite de repetibilidade, em valor percentual, para cada um dos níveis de concentração estudados, apresentados na **tabela 18**.

Tabela 18 – Resultados obtidos para os parâmetros repetibilidade (S_r), precisão entre grupos (S_{run}), precisão intermédia (S_1) coeficiente de variação (CV) e limite de repetibilidade (r), para cada um de três níveis de concentração de GHB-GLUC.

CQ	S_r (ng/mL)	S_{run} (ng/mL)	S_1 (ng/mL)	CV (%)	r (%)
1000 ng/mL	119,54	260,14	286,30	6,55	18,35
2500 ng/mL	166,77	782,15	799,73	5,21	14,57
4000 ng/mL	307,74	1158,77	1197,16	4,88	13,68

Os resultados obtidos permitem definir, para efeitos de validação e trabalho de rotina, um limite de repetibilidade de 20% para o GHB-GLUC. Na prática, aceitam-se duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se a diferença entre ambas for igual ou inferior ao limite de repetibilidade definido.

Pela análise da **tabela 18**, verifica-se, ainda que o CV da gama alta (4000 ng/mL) é consideravelmente inferior a 10%, enquanto que o mesmo parâmetro da gama baixa é inferior a 20%. Estes resultados cumprem com o procedimento técnico de validação do SQTf-N e podem ser aceites (**Anexo A**). Apesar de não existir critério para a gama intermédia (a 2500 ng/mL neste trabalho), considera-se que este apresenta um CV aceitável, uma vez que é inferior a 10%, o mínimo estipulado no procedimento de validação para a gama alta.

3.2.8- Avaliação da Exatidão e Estimativa da Incerteza

A quantificação da incerteza da medição foi realizada com base na abordagem baseada em dados da validação do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial, utilizando os mesmos dados obtidos no estudo da precisão. Esta foi a abordagem escolhida dada a impossibilidade de realização de ensaios interlaboratoriais para o GHB-GLUC. A aplicação desta abordagem consiste na combinação das incertezas associadas à precisão e à veracidade do método. Na sequência dos ensaios experimentais necessários à quantificação dos parâmetros referidos existem fontes de incerteza relevantes que, sendo constantes, na sequência do estudo da exatidão do método, consideram-se desprezáveis (87).

A incerteza associada à precisão deverá ser avaliada em condições de precisão intermédia (em vez de condições de repetibilidade), de modo a refletir eventuais variações do desempenho do método em função de alterações de parâmetros experimentais (que habitualmente são mantidos constantes no mesmo dia de trabalho) (87).

Assume-se que a incerteza padrão associada à precisão ($u_{\text{precisão}}$) será igual ao desvio-padrão dos resultados obtidos no estudo da precisão ($S_{\text{precisão}}$). A exatidão do método foi avaliada com base no cálculo da recuperação média (\bar{R}_m), através da divisão entre a concentração média calculada da série de amostras fortificadas ($\bar{C}_{\text{calc.}}$) e a concentração com que se fortificaram as amostras ($C_{\text{fortificada}}$), como demonstrado na **equação 9**. Com o valor da recuperação média foi possível calcular a incerteza associada à exatidão, $u(\bar{R}_m)$, com base na **equação 10**, estando os resultados apresentados na **tabela 19**.

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{\text{calc.}}}{C_{\text{fortificada}}} \quad (\text{Equação 9})$$

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{S_R^2}{n}} \quad (\text{Equação 10})$$

sendo (S_R^2/n) a variância associada às recuperações individuais estimadas a dividir pelo número de ensaios realizados, neste caso 16.

Tabela 19 – Resultados da recuperação média (\bar{R}_m) e da incerteza associada à exatidão ($u(\bar{R}_m)$), para cada um dos níveis de concentração, a 1000 ng/mL, 2500 ng/mL e a 4000 ng/mL de GHB-GLUC.

Nível (ng/mL)	\bar{R}_m	$u(\bar{R}_m) / \%$
1000	1,31	7,69
2500	0,98	3,83
4000	1,12	3,84

Uma vez estimada a incerteza associada à exatidão do método, torna-se necessário avaliar se os resultados são afetados por desvios sistemáticos que necessitem de correção. Esta avaliação pode ser realizada através de um teste *t-student*, sendo o valor de $t_{exp.}$ calculado a partir da **equação 11** e o $t_{crit.}$ retirado de uma tabela *t-student* bilateral com 15 (n-1) graus de liberdade e a um nível de confiança de 95%. Os resultados apresentam-se na **tabela 20**.

$$t_{exp.} = \frac{|1 - R_m|}{u(\bar{R}_m)} \quad (\text{Equação 11})$$

Tabela 20 – Resultados do teste *t-student* para a incerteza-padrão associada à exatidão dos resultados.

Nível (ng/mL)	$t_{exp.}$	$t_{crit.}$
1000	3,987	2,131
2500	0,461	2,131
4000	3,254	2,131

O teste *t-student* realizado permite avaliar se a recuperação do método é significativamente diferente de 1, ou seja, 100%. Como se verifica na **tabela 20**, no segundo nível de concentração, a 2500 ng/mL, verifica-se a condição $t_{exp} < t_{crit.}$, sendo possível considerar que a recuperação do método não foi significativamente diferente de 1. Nesta situação, o resultado do ensaio não foi corrigido em termos de exatidão e a incerteza padrão relativa, $u'(\bar{R}_m)$, é considerada equivalente à incerteza padrão $u(\bar{R}_m)$. Por outro lado, quando a recuperação média do método é significativamente diferente de 1, isto é, quando $t_{exp} > t_{crit.}$, como ocorreu nos níveis de concentração 1000 ng/mL e 4000 ng/mL, torna-se necessário proceder à correção dos resultados em termos de exatidão, sendo a incerteza-padrão relativa, $u'(\bar{R}_m)$, estimada pela **equação 12**.

$$u'(\bar{R}_m) = \frac{u(\bar{R}_m)}{\bar{R}_m} \quad (\text{Equação 12})$$

Após determinação correção e determinação da incerteza-padrão relativa associada à exatidão, foi possível calcular a incerteza-padrão combinada, $u(y)$, de uma determinada grandeza y , através da **equação 13**.

$$u(y) = y \times \sqrt{(u'_{\text{precisão}})^2 + (u'(\bar{R}_m))^2} \quad (\text{Equação 13})$$

Uma vez que as várias componentes da incerteza foram estimadas recorrendo a um número elevado de ensaios experimentais, foi possível estimar a incerteza expandida combinada, $U(y)$, para um nível de confiança aproximadamente igual a 95%, a partir da multiplicação de um $u(y)$ por um fator de expansão igual a 2. Os resultados obtidos da incerteza-padrão relativa, da incerteza-padrão combinada e da incerteza expandida combinada encontram-se representados na **tabela 21**.

Tabela 21 – Resultados obtidos da incerteza-padrão relativa, $u'(\bar{R}_m)$, da incerteza-padrão combinada, $u(y)$, e da incerteza expandida combinada, $U(y)$, para cada um dos níveis de concentração.

Nível (ng/mL)	$u'(\bar{R}_m)$ / %	$u(y)$ / %	$U(y)$ / %
1000	5,88	24,26	48,52
2500	3,83	16,05	32,09
4000	3,41	14,07	28,15

Pela análise da **tabela 21** é possível verificar que o valor estimado de incerteza variou desde 28,15% a 48,52%. É ainda de salientar que o menor valor de incerteza expandida combinada se verificou no nível de concentração mais elevado (4000 ng/mL) e o maior valor deste parâmetro no nível de concentração mais baixo (1000 ng/mL).

3.2.9- Robustez

Durante todo o processo de validação, fizeram-se variar vários parâmetros, seja de forma variada e/ou no âmbito do normal funcionamento dos equipamentos, não se obtendo diferenças nos resultados analíticos. Os parâmetros modificados incluem a utilização de diferentes soluções de trabalho, quer de analitos, quer de padrões internos, utilização de pipetas diferentes, evaporação dos eluatos em evaporador de N₂ com temperatura definida por banho, sujeita aos desvios inerentes ao próprio equipamento; temperatura de derivatização, entre outros parâmetros.

3.3- Quantificação de GHB-GLUC e GHB em amostras reais

Nesta secção procedeu-se à aplicação do método anteriormente validado para a quantificação de GHB-GLUC, bem como ao método previamente validado pelo SQTF-N para a quantificação do GHB, em amostras reais. Apresenta-se na secção **3.3.1** o estudo de uma amostra correspondente ao único caso de intoxicação por GHB *in vivo* detetado pelo SQTF. A secção **3.3.2** apresenta o estudo de uma série de amostras de sangue periférico *post-mortem* com data e hora de óbito conhecidas, com duas colheitas em datas e horas também conhecidas. Todas as amostras estudadas neste capítulo foram quantificadas com base em curvas de calibração realizadas contemporaneamente à preparação das mesmas, tendo-se preparado duas alíquotas por amostra.

3.3.1- Quantificação de GHB-GLUC e GHB num caso positivo para GHB

Na amostra de soro positiva para GHB verificou-se a presença de GHB-GLUC. No entanto, a concentração de GHB é tão elevada que o pico analítico do referido composto de certa forma mascara o sinal analítico do padrão interno (GHB-D₆), não sendo possível quantificar, de forma fiável, nem o GHB nem o GHB-GLUC. Como alternativa, de forma a se proceder à quantificação do metabolito em estudo, procedeu-se à diluição de uma réplica da amostra de soro (fator de diluição=10), tendo-se obtido uma concentração de GHB-GLUC de 13 700 ng/mL.

Neste estudo incluíram-se, também, amostras controlo de sangue, nas quais se verificou a ausência de GHB-GLUC, na gama de trabalho em estudo. Estes resultados permitem deduzir que as concentrações de GHB-GLUC sanguíneas consideradas endógenas deverão ser abaixo do limite inferior da gama de trabalho, ou seja, abaixo de 200 ng/mL. Em concordância, na literatura, concentrações entre 11 ng/mL e os 67 ng/mL foram descritas como concentrações endógenas de GHB-GLUC no plasma (49).

Apesar da amostra em estudo ser pequena (apenas uma amostra), o presente estudo assume importância, uma vez que, na literatura consultada, até à data, não existe nenhum estudo em que se realiza a quantificação de GHB-GLUC num caso de intoxicação por consumo exógeno de GHB (para fins recreativos), como o realizado neste trabalho. Na literatura, apenas foi realizada a quantificação de GHB-GLUC sanguíneo em pacientes com

narcolepsia, após a toma controlada de Xyrem®, a formulação terapêutica do GHB (25,61,63). Os estudos citados apresentam dois tipos de resultados: não se obtiveram concentrações de GHB-GLUC quantificáveis, ou seja, abaixo do valor do respetivo valor de LOQ (e acima do LOD) (25,61), ou não se verificaram diferenças entre as concentrações do composto em estudo nos pacientes com narcolepsia, após toma da medicação, e as concentrações do mesmo no grupo controlo (63). Assim, pelos resultados descritos, os autores sugerem que as concentrações de GHB-GLUC sanguíneas não são afetadas pela administração de Xyrem®, ou seja, pelo consumo exógeno controlado de GHB (25,61,63).

No entanto, neste trabalho, a concentração de GHB-GLUC, para a amostra em estudo, é de 13 700 ng/mL, um valor bastante superior aos valores considerados endógenos (49). Ou seja, neste trabalho, verificou-se uma relação entre um contexto de intoxicação por GHB e uma concentração de GHB-GLUC mais elevada do que o esperado, provavelmente pela saturação das vias metabólicas de eliminação do GHB. No entanto, torna-se necessário um estudo com maior número de amostras correspondentes a suspeitas de consumo de GHB para fins recreativos.

3.3.2- Quantificação de GHB-GLUC e GHB em amostras *post-mortem*

Nesta seção procedeu-se ao estudo e à quantificação de GHB e de GHB-GLUC num conjunto de amostras de sangue periférico *post-mortem*, com a particularidade de se ter informação acerca da data e hora do óbito, bem como de cada uma das duas colheitas realizadas. Com os dados obtidos foi possível calcular o intervalo *post-mortem* (PMI, em horas), para cada uma das colheitas (**Tab. 22**). Para a quantificação das amostras foi preparada uma curva de calibração na gama de trabalho 200 -5 000 ng/mL para o GHB-GLUC e na gama 200 -15 000 ng/mL, para o GHB.

Tabela 22 – Dados do conjunto de processos estudados, a idade e o género do indivíduo, assim como o intervalo *post-mortem*, em horas, da primeira e da segunda colheitas.

Processo	Óbito		PMI (horas)	
	Idade	Sexo	1ª Colheita	2ª Colheita
1	19	F	4,6	9,1
2	45	M	4,1	23,1
3	67	M	3,2	22,9
4	75	M	7,9	22,9
5	84	M	4,9	20,3
6	29	M	2,1	23,7
7	84	F	10,3	26,3
8	32	M	7,0	30,2
9	84	F	9,0	23,5

Após análise dos resultados, foi possível obter a concentração de GHB em cada uma das amostras, estando os resultados apresentados na **tabela 23**. No entanto, em nenhuma das amostras em estudo se verificou a presença de GHB-GLUC. Como referido na **secção 1.4**, está descrito na literatura um aumento da concentração de GHB *post-mortem* o que, consequentemente, poderia conduzir a um aumento da concentração do metabolito glucuronizado do GHB. No entanto, até ao momento, não existe reportado nenhum estudo em que se realiza a quantificação do GHB-GLUC em amostras *post-mortem*.

Na literatura apenas se realizou a quantificação de GHB-GLUC numa amostra *post-mortem* de urina, por intoxicação de GHB (63), no qual obtiveram uma concentração de 550 ng/mL. Assim, o facto de, no presente estudo não se ter verificado a presença de GHB-GLUC em nenhuma amostra *post-mortem*, permite levantar questões relativas à real importância desta via de metabolização do GHB, nomeadamente no *post-mortem*, questão também levantada num estudo recente (61).

Por outro lado, neste estudo, assim como em todos os estudos da literatura em que se quantifica GHB-GLUC (25,47,49,61,63,70), estuda-se o GHB glucuronizado no terminal hidroxilo. Este é o metabolito estudado uma vez que é o único produto formado *in vivo* pela enzima UPD-glucuronosiltransferase e, também, devido à maior estabilidade deste glucurónido comparativamente à estabilidade do composto acil-glucuronizado (47,49). Como não existem estudos acerca do mecanismo de glucuronização do GHB, ambos os terminais carboxílicos e hidroxilos do GHB podem sofrer glucuronização, podendo existir

in vivo ambos os metabolitos referidos, assim como, eventualmente, compostos glucuronizados em ambos os terminais (*bis*-glucuronizados) (25,49). Desta forma, como trabalho futuro, seria interessante avaliar a presença do metabolito do GHB glucuronizado no terminal carboxílico, assim como a presença do metabolito *bis*-glucuronizado.

Tabela 23 – Resultados da concentração de GHB (mg/L) na primeira e segunda colheita. A concentração apresentada em cada caso é resultante da média de concentrações obtidas em ambas as réplicas. Estão também apresentados os intervalos, em horas, desde a morte até à colheita da amostra, ou seja, o intervalo *post-mortem* (PMI).

Processo	1ª Colheita		2ª colheita	
	[GHB]média (mg/L)	PMI (horas)	[GHB]média (mg/L)	PMI (horas)
1	3,8	4,6	6,7	9,1
2	1,9	4,1	7,0	23,1
3	1,8	3,2	12,2	22,9
4	7,2	7,9	15,9	22,9
5	2,1	4,9	9,3	20,3
6	0,8	2,1	8,1	23,7
7	12,0	10,3	22,9	26,3
8	2,8	7,0	11,4	30,2
9	6,5	9,0	9,4	23,5

Pela análise da **tabela 23**, é possível verificar que, na segunda colheita da amostra correspondente ao processo 7, o valor obtido de concentração sanguínea de GHB está acima de 15 000 ng/mL, ou seja, acima do limite superior da gama de trabalho estipulada e utilizada. Nestes casos, seria necessário proceder à diluição da amostra de forma à sua concentração se encontrar na gama de trabalho utilizada. No presente trabalho, não se realizou essa mesma diluição de forma a não gastar um maior volume de amostra real que será necessário para trabalhos futuros, tendo sido o resultado obtido de 22 933 ng/mL, descartado. É de salientar que as concentrações sanguíneas de GHB obtidas neste trabalho, para todos os casos analisados, foram inferiores ao valor de *cut-off* de 30 000 ng/mL (30 mg/L). Este é o valor de *cut-off* proposto por vários autores (62,71), para auxiliar na distinção entre os valores endógenos de GHB e os valores resultantes do consumo exógeno desse composto, em amostras *post-mortem*. O menor valor obtido foi de 802 ng/mL e o maior de 15 887 ng/mL.

Procedeu-se à avaliação de vários fatores que poderiam afetar a concentração de GHB endógena obtida, tais como o género e a idade. O conjunto de amostras estudados compreendeu 3 indivíduos do sexo feminino [33,3(3) %] e 6 indivíduos do sexo masculino [66,6(6) %]. Não foi obtida uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos feminino e masculino, quer na primeira colheita, quer na segunda, como representado na **figura 25**. As amostras em estudo foram também divididas em 2 faixas etárias, uma que compreende idades inferiores a 50 anos e outra que compreende idades superiores a 50 anos. Os resultados da comparação das concentrações de GHB em cada uma das faixas etária está representado na **figura 26**, comparação esta realizada para ambas as colheitas. Apesar de se verificar uma menor concentração sanguínea de GHB na faixa etária mais jovem, em ambas as colheitas, esta diferença não se revelou estatisticamente significativa.

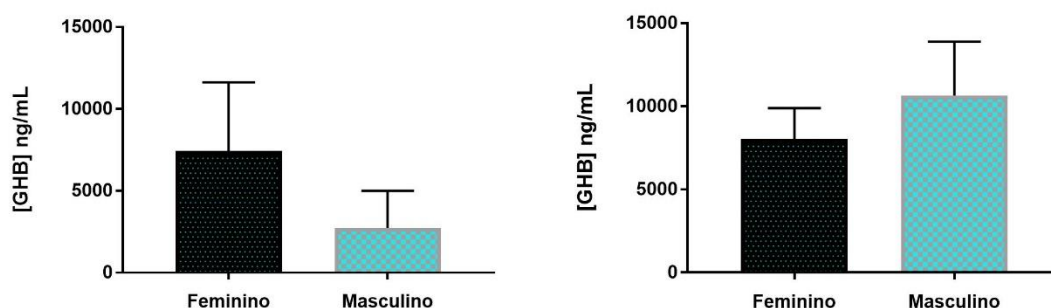


Figura 25 – Comparação das concentrações médias de GHB (ng/mL) entre géneros na primeira colheita e segunda colheitas. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio-padrão (*Mann-Whitney test*).

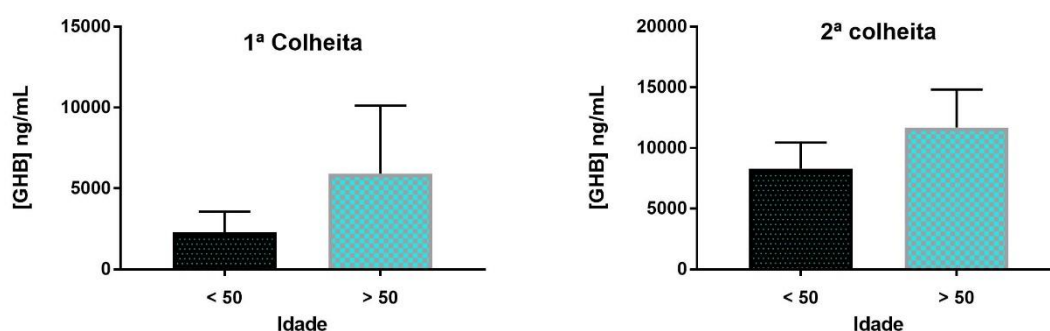


Figura 26 - Comparação entre as concentrações médias de GHB (ng/mL) dos indivíduos com idade inferior a 50 anos e os indivíduos com idade superior a 50 anos, na primeira e segunda colheita. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio-padrão (*t-test* não emparelhado).

Apesar da amostra em estudo ser pequena, os resultados obtidos sugerem que nem o género nem a idade dos indivíduos têm influência estatisticamente significativa sobre os níveis sanguíneos de GHB *post-mortem*. Estes resultados estão de acordo com outros estudos publicados (59,71), com amostras em maior número, nos quais não se verificaram alterações significativas nas concentrações sanguíneas de GHB pela idade e/ou género.

Como acima descrito, realizaram-se duas colheitas de sangue periférico, em dois momentos diferentes. De forma a podermos comparar as concentrações de GHB em ambas as colheitas, realizou-se um *t-test* emparelhado, cujos resultados estão representados na **figura 27**. Verificou-se uma diferença significativa ($P < 0,001$) entre as concentrações médias de GHB na primeira colheita (4 310 ng/mL) e na segunda colheita (10 003 ng/mL). Esta diferença seria expectável, uma vez que a primeira colheita foi realizada a um PMI médio de aproximadamente 6 horas, enquanto a segunda colheita foi realizada a um PMI médio de 22 horas e está descrito na literatura (71) um aumento da concentração de GHB com o aumento do PMI até um máximo de 72 horas.

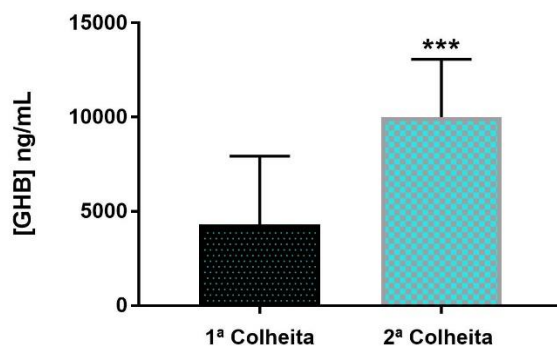


Figura 27 – Comparação entre a concentração média de GHB (ng/mL) na primeira colheita realizada e a concentração média do mesmo metabolito na segunda colheita. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio-padrão das nove amostras em estudo ($n=9$). *** $P < 0,001$ vs 1ª Colheita (*t-test* emparelhado).

Até ao momento, não foi publicado nenhum estudo em que tenham sido avaliadas as concentrações de GHB em intervalos *post-mortem* tão curtos como os referidos no presente trabalho. No entanto, Andresen-Streichert *et al.* (62), sugerem que a maioria das alterações

no corpo, descritas na secção 1.3 ocorre nas primeiras horas após a morte (62). Com o objetivo de detetar associações entre as concentrações sanguíneas de GHB e o PMI, calculou-se o fator de correlação de *Pearson* (r), para cada uma das colheitas, estando os resultados obtidos representados nas **figuras 28 e 29**. Na primeira colheita, na qual o PMI variou de um mínimo de 2,1 horas até 10,3 horas, obteve-se um valor de coeficiente de correlação de 0,902 (**Fig. 28**); enquanto na segunda colheita, em que o PMI variou entre 9,1 horas e 30,2 horas, se obteve um coeficiente de correlação de *Pearson* de 0,432 (**Fig. 29**).

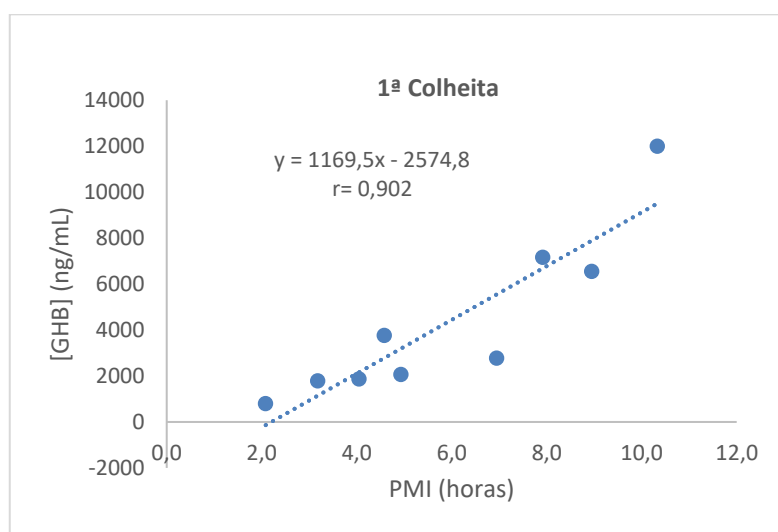


Figura 28 – Relação entre a concentração endógena de GHB no sangue periférico (ng/mL) e o intervalo *post-mortem* (horas), dos resultados obtidos na primeira colheita. Os resultados apresentados são a média das duas réplicas realizadas.

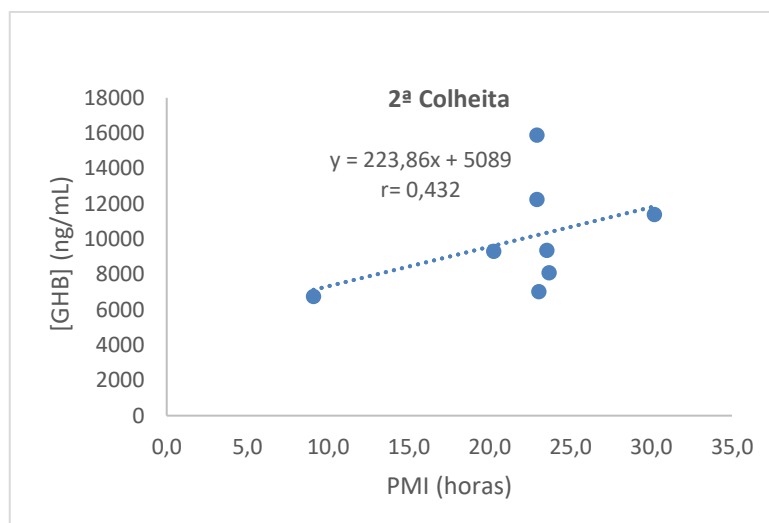


Figura 29 – Relação entre a concentração endógena de GHB no sangue periférico (ng/mL) e o intervalo *post-mortem* (horas), dos resultados obtidos na segunda colheita. Os resultados apresentados são a média das duas réplicas realizadas.

O valor de r obtido com os resultados da primeira colheita ($r=0,902$), sugere uma correlação positiva forte entre o PMI e a concentração de GHB. O valor de r obtido (0,902) é consideravelmente superior comparativamente aos descritos na literatura consultada (62,75). Com efeito, Andresen-Streichert *et al.* (62), verificaram uma ligeira correlação entre o PMI e a concentração endógena de GHB em urina, em que obtiveram um valor de r de 0,476 e, também, em humor vítreo, no qual o valor de r obtido foi de 0,407. No estudo citado (62), não verificaram qualquer correlação entre o PMI e a concentração de GHB em sangue venoso, sangue cardíaco e fluido cefalorraquidiano. No entanto, Moriya *et al.* (75), verificaram uma correlação positiva entre o PMI e a concentração de GHB sanguínea, com um valor de r de 0,571, ou seja, superior ao anterior.

Avaliou-se, também, a relação entre a diferença de PMI entre a segunda e a primeira colheita e a diferença de concentrações relativas de GHB entre ambos os momentos (**Fig. 30**). O Δ PMI obtido foi desde 4,5 e 23,3, tendo-se obtido um valor de coeficiente de correlação de 0,694. Assim, verificou-se uma correlação positiva, maior comparativamente aos valores de r obtidos na literatura (62,75) e ao valor de r obtido para a relação entre a concentração de GHB e o PMI na segunda colheita (**Fig. 28**); no entanto, menor comparativamente ao valor de r obtido para a relação referida na primeira colheita, ou seja, para um PMI até cerca de 10 horas.

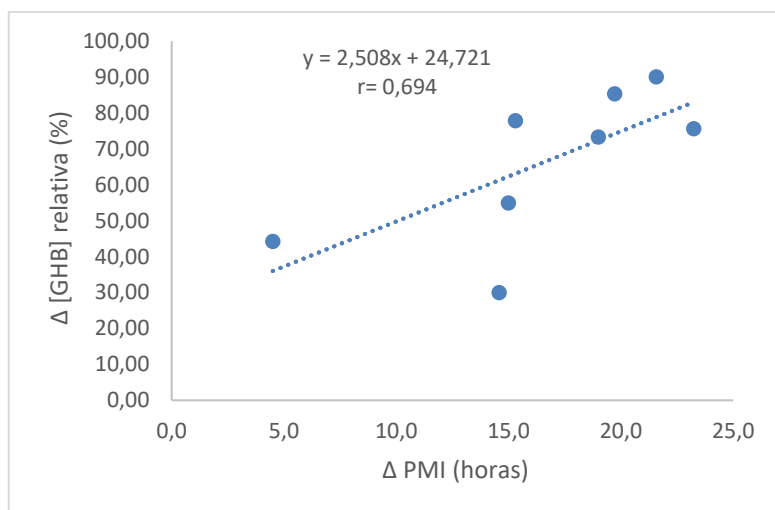


Figura 30 – Relação entre a variação de concentrações endógenas de GHB no sangue periférico relativas (%) e a variação entre os intervalos *post-mortem* (horas), variação esta entre a segunda colheita e a primeira colheita.

Os resultados obtidos sugerem que nas primeiras 10 horas após a morte é quando existe uma maior correlação entre o PMI e a concentração de GHB ($r=0,902$). Estes resultados estão em concordância com o trabalho de Moriya *et al.* (75), em que sugerem que quantidades substanciais de GHB devem ser produzidas poucas horas após a morte. Como trabalho futuro, seria importante obter uma amostra em maior número a fim de confirmar a correlação entre o PMI e a concentração de GHB verificada neste trabalho para as primeiras 10 horas após a morte e, também, conseguir estabelecer uma correlação para intervalos *post-mortem* mais elevados.

4– Conclusões e Perspetivas Futuras

4- Conclusões e Perspetivas Futuras

A quantificação simultânea do GHB, do seu metabolito glucuronizado (GHB-GLUC) e do GABA em amostras reais assume particular interesse numa tentativa de colmatar, de alguma forma, determinadas dificuldades na área forense, apresentadas na revisão da literatura efetuada. Uma das dificuldades referidas inclui o facto do GHB ser rapidamente eliminado do organismo (cerca de 12 horas) contribuindo, possivelmente, para a não deteção deste composto em caso de consumo recreativo e/ou em casos de abuso sexual sob o efeito do mesmo. Outra dificuldade, bastante descrita na literatura, está associada à dificuldade em estimar, com precisão, o intervalo *post-mortem*. Tendo em consideração o potencial da determinação simultânea dos três metabolitos referidos, neste trabalho pretendeu-se validar um método analítico, em GC-MS/MS, para deteção e quantificação do GHB-GLUC e do GABA em amostras reais, com o objetivo de complementar o método previamente validado no Serviço de Química e Toxicologia Forenses para o GHB.

Inicialmente, procedeu-se à derivatização (com BSTFA+1% TMCS) dos compostos-alvo para posterior estudo dos mecanismos de fragmentação do GABA, do GHB-GLUC e do seu análogo deuterado (GHB-GLUC-D₄), após ionização por impacto eletrónico em GC-MS/MS. Verificou-se que é possível separar todos os compostos em termos cromatográficos, nas condições estabelecidas, uma vez que estes apresentam tempos de retenção diferentes (min.). Neste estudo, o procedimento de derivatização foi realizado a 65°C, durante 30 minutos.

Neste estudo, selecionando o ião molecular, são propostos os mecanismos de fragmentação que se consideram mais prováveis na formação dos iões fragmento gerados na fonte. Para tal, estudaram-se os mecanismos de fragmentação por EI característicos dos derivados de TMS, nomeadamente, a eliminação de grupos TMSOH bem como de grupos metilo ligados ao Si, o rearranjo dos grupos sililados e a tendência migratória de grupos TMS. O estudo realizado permitiu auxiliar na escolha dos iões precursores e, também, dos iões produto (iões de quantificação e de diagnóstico). Realizou-se a escolha dos iões com simultâneas razões *m/z* e abundâncias relativas elevadas, de forma a aumentar a probabilidade destes iões serem o mais característicos possível para o composto em causa.

Até à data, não está reportado nenhum estudo das vias de fragmentação, nem do GHB-GLUC, nem do GABA. Considerando a importância do referido estudo para a escolha

dos iões precursores e dos iões produto sugere-se, como trabalho futuro, recorrer-se à espetrometria de massa em *tandem* (MSⁿ), com $n > 2$. Outra alternativa seria a espetrometria de massa *tandem* de alta resolução. Nesta técnica, a alta precisão do cálculo de massa molecular permite a determinação exata da fórmula do fragmento. O recurso às técnicas referidas permitiria apresentar, de forma ainda mais sustentada, os mecanismos de fragmentação dos composto-alvo.

Procedeu-se, de seguida, à validação do método analítico em amostras de sangue total. No entanto, não foi possível validar o método analítico para a quantificação do GABA, uma vez que, durante os testes de pré-validação, verificou-se instabilidade do GABA, com a obtenção de resultados não reprodutíveis.

Desta forma, realizou-se a validação do método analítico apenas para o GHB-GLUC e, tendo em conta os resultados obtidos, optou-se por uma precipitação proteica com o solvente metanol, como um procedimento extrativo. Esta apresenta diversas vantagens, nomeadamente, a rapidez e o baixo custo associado. Foram testados diferentes parâmetros de validação de um método analítico, nomeadamente a especificidade/seletividade, não se tendo verificado qualquer falso positivo ou falso negativo. Na gama de trabalho estipulada (200 – 5000 ng/mL), não se verificou a homocedasticidade das variâncias. Desta forma, escolheu-se o fator de ponderação $1/y$, uma vez que este apresentou uma melhor posição de *ranking* final aferido com base em diferentes parâmetros, nomeadamente o limite de repetibilidade, a incerteza expandida e o somatório de erro relativo. Quanto aos limites de deteção e de quantificação obtidos consideraram-se adequados ao propósito do método, ou seja, a quantificação do GHB-GLUC em casos de intoxicação por GHB e em amostras *post-mortem*. É ainda de salientar que não se verificaram fenómenos de arrastamento. Relativamente ao rendimento médio de extração obtido (50,60%), verificou-se que este é inferior aos valores descritos na literatura. Assim, numa tentativa de otimizar o rendimento de extração poderiam testar-se diferentes solventes para extração LLE ou testar-se uma outra extração SPE. Para além disso, poderia testar-se o aumento do volume de amostra utilizado (neste trabalho foi de 100 µL) e/ou aumentar o volume de solvente utilizado durante o procedimento extrativo (neste trabalho foi de 200 µL). Foi também avaliada a precisão a dois níveis diferentes, nomeadamente a precisão intermédia (Sr) e o limite de repetibilidade, tendo-se definido, para efeitos de validação e trabalho de rotina, um limite de repetibilidade

de 20% para o GHB-GLUC, para todos os níveis de CQ (1000, 2500 e 4000 ng/mL). Neste trabalho, não foi avaliada a reprodutibilidade, uma vez que não foi possível a realização de ensaios interlaboratoriais. Relativamente à exatidão, procedeu-se ao estudo da estimativa da incerteza de medição, tendo-se calculado a incerteza-padrão relativa, a incerteza-padrão combinada e, a incerteza expandida combinada sendo que, a mesma variou desde 28,15% (CQ3: 4000 ng/mL) a 48,52% (CQ1: 1000 ng/mL).

A validação de um método analítico é um processo analítico dinâmico. Assim, é necessário ter em consideração que o mesmo deve ser alvo de constantes melhorias. Neste sentido, propõe-se que, quando comercializado, se recorra ao análogo deuterado do GHB-GLUC (o GHB-GLUC-D₄) como padrão interno, ao invés do GHB-D₆ utilizado neste trabalho. Também se considera importante a realização futura de um estudo da estabilidade das soluções padrão do GHB-GLUC, bem como de estabilidade das soluções após o processo de derivatização. Neste estudo seriam avaliados os fatores temperatura e tempo, com o objetivo de se determinar a que temperatura as soluções padrão apresentam uma determinada estabilidade durante mais tempo. Seria também importante determinar quanto tempo, à temperatura ambiente (temperatura do auto-amostrador), as soluções dos compostos derivatizados se mantêm estáveis. Por fim, seria ainda relevante, estudar o efeito de ciclos de congelação/dcongelação em amostras reais na estabilidade do composto em estudo. O estudo de estabilidade referido para o GHB-GLUC poderia ser realizado para o GABA para, após otimização das temperaturas ideias de armazenamento, se proceder à seleção do procedimento extrativo mais adequado e à validação do método analítico recorrendo idealmente a um análogo deuterado do GABA.

O método analítico validado para a quantificação do GHB-GLUC foi aplicado a amostras reais, nomeadamente à única amostra detetada como positiva, até à data, para o GHB, no SQTF. Nesta amostra de soro, após diluição, foi possível obter uma concentração de GHB-GLUC de 13 700 ng/mL. Assim, até à data, este é o primeiro estudo em que se verifica uma relação entre o consumo exógeno de GHB e a presença, numa concentração elevada, de GHB-GLUC. No entanto, torna-se necessário um estudo com maior número de amostras correspondentes a suspeitas de consumo de GHB para fins recreativos.

O método agora validado, aliado ao método previamente validado para o GHB, foi aplicado a uma série de nove amostras *post-mortem*, contendo informação acerca da data e

hora do óbito e de cada uma das duas colheitas realizadas, uma aquando da admissão do cadáver e outra na autópsia. Apesar de não se ter verificado a presença de GHB-GLUC em nenhuma das amostras, o presente estudo assume importância dada a sua unicidade, uma vez que, até ao momento, não existe reportado na literatura, a determinação das concentrações *post-mortem* endógenas (sem consumo exógeno de GHB), em qualquer tipo de matriz biológica. O estudo realizado permitiu levantar diversas hipóteses, sendo que uma aponta para o facto das concentrações de GHB-GLUC *post-mortem* em amostras de sangue serem inferiores ao limite de deteção deste método (52,65 ng/mL). Assim, a não deteção do GHB-GLUC em nenhuma das amostras permite, também, levantar questões relativas à real importância desta via de metabolização do GHB, nomeadamente no contexto *post-mortem*. Uma vez que neste e em todos os estudos da literatura se estuda o GHB glucuronizado no terminal hidroxilo, seria importante, num estudo futuro, avaliar a presença do metabolito do GHB glucuronizado no terminal carboxílico, assim como a presença do metabolito *bis-glucuronizado*.

Relativamente às concentrações de GHB, obtiveram-se concentrações consideradas endógenas para amostras *post-mortem* de sangue total. Na amostra em estudo, verificou-se que, nem o género nem a idade têm influência estatisticamente significativa sobre os níveis sanguíneos de GHB *post-mortem*. No entanto, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações médias do composto-alvo na primeira colheita e na segunda colheitas. É ainda importante referir que os resultados obtidos sugerem que, nas primeiras 10 horas após a morte (primeira colheita) é quando existe uma maior correlação entre o PMI e a concentração de GHB ($r=0,902$). Ainda de salientar a correlação positiva verificada entre a variação de concentrações endógenas de GHB relativas e a variação entre os intervalos *post-mortem*, variação esta entre a segunda colheita e a primeira ($r=0,694$). Como trabalho futuro, seria importante o estudo de um maior número de casos, a fim de se conseguir estabelecer uma correlação para intervalos *post-mortem* acima das 10 horas, permitindo auxiliar na estimação do PMI.

4– Bibliografia

4- Bibliografia

1. Timbrell J. Introduction to Toxicology. 3ª Edição. Taylor & Francis; 2002.
2. Langman LJ, Kapur BM. Toxicology: Then and now. Clin Biochem. 2006;39(5):498–510.
3. Canãdas E.V, Martinez A. JA. Medicina Legal y Toxicología. 5ª Edição. Barcelona: Masson; 2001.
4. Levine B. Principles of Forensic Toxicology. 2ª Edição. American Association for Clinical Chemistry; 2003.
5. Wyman JF. Principles and procedures in forensic toxicology. Clin Lab Med. 2012;32(3):493–507.
6. Smith MP, Bluth MH. Forensic Toxicology: An introduction. Clin Lab Med. 2016;36(4):753–9.
7. Portarias nº 902-A/2007 e 902-B/2007 de 13 de Agosto de 2007 dos Ministérios da Administração Interna, da Justiça e da Saúde [Internet]. Diário da República: I Série, Nº 155 2007. Available from: www.dre.pt (acedido em 8 de Setembro de 2017)
8. Castro A. Determinação de ácido γ -hidroxibutírico (GHB) em sangue, urina e cabelo por GC-MS/MS. Avaliação de níveis endógenos e exógenos e sua aplicação nas áreas da Clínica e Patologia Forense. Universidade do Porto; 2016.
9. Klaassen CD, Amdur M. Cassarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. 6ª Edição. McGraw-Hill; 2001.
10. Buck K, Voehringer P, Ferger B. Rapid analysis of GABA and glutamate in microdialysis samples using high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. J Neurosci Methods. 2009;182(1):78–84.
11. Liu B, Wang G, Gao D, Gao F, Zhao B, Qiao M, et al. Alterations of GABA and glutamate – glutamine levels in premenstrual dysphoric disorder: A 3T proton magnetic resonance spectroscopy study. Psychiatry Res Neuroimaging. 2015;231(1):64–70.
12. Busardò FP, Jones AW. GHB Pharmacology and Toxicology: Acute Intoxication, Concentrations in Blood and Urine in Forensic Cases and Treatment of the Withdrawal Syndrome. Curr Neuropharmacol. 2015;13(1):47–70.
13. Mason PE, Kerns WP. Gamma hydroxybutyric acid (GHB) intoxication. Acad Emerg Med. 2002;9(7):730–9.
14. Nicholson KL, Balster RL. GHB: a new and novel drug of abuse. Drug Alcohol Depend. 2001;63(1):1–22.
15. Crowley T, Cryan JF, Downer EJ, Leary OF. Inhibiting neuroinflammation : The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. Brain Behav Immun. 2016;54:260–77.
16. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. Mol Psychiatry. 2003;8(8):721–37.
17. Song Y, Shenwu M, Dhossche DM, Liu Y. A capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the quantification of γ -aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid. J Chromatogr B. 2005;814(2):295–302.
18. Dhossche D, Applegate H, Abraham A, Maertens P, Bland L, Bencsath A, et al. Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism. Med Sci Monit. 2002;8(8):1–6.
19. Vieira DSS, Naffah-Mazacoratti MG, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Faulhaber MHW, et al. Cerebrospinal fluid GABA levels in chronic migraine with and without depression. Brain Res. 2006;1090(1):197–201.
20. Petty F. Plasma concentrations of gamma-aminobutyric acid (GABA) and mood disorders: a blood test for manic depressive disease? Clin Chem. 1994;40(2):296–302.
21. Soriano T, Jurado C, Menéndez M, Repetto M. Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. J Anal Toxicol. 2001;25(2):137–43.
22. Couper F, Marinetti L. gamma-Hydroxybutyrate(GHB)-- Effects on Human Performance and Behavior. Forensic Sci Rev. 2002;14(1):101–21.
23. Brown SD, Melton TC. Trends in bioanalytical methods for the determination and quantification of club drugs: 2000-2010. Biomed Chromatogr. 2011;25(1):300–21.
24. Cai H, Zhu R, Li H. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal Biochem. 2010;396(1):103–11.
25. Busardò FP, Kyriakou C, Marchei E, Pacifici R, Sejer Pedersen D, Pichini S. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. J Pharm Biomed Anal. 2017;137:123–31.

26. Arashida N, Nishimoto R, Harada M, Shimbo K, Yamada N. Highly Sensitive Quantification for Human Plasma-Targeted Metabolomics Using an Amine Derivatization Reagent. *Anal Chim Acta*. 2017;954:77–87.
27. Trontelj J. Quantification of Glucuronide Metabolites in Biological Matrices by LC-MS/MS. *Tandem Mass Spectrom - Appl Princ*. 2012;531–58.
28. Zacharis CK, Theodoridis GA, Voulgaropoulos AN. On-line coupling of sequential injection with liquid chromatography for the automated derivatization and determination of γ -aminobutyric acid in human biological fluids. *J Chromatogr B*. 2004;808(2):169–75.
29. Eckstein JA, Ammerman GM, Reveles JM, Ackermann BL. Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS. *J Neurosci Methods*. 2008;171(2):190–6.
30. Cao, Li-Wei; Tan, Xiao-Fang; Li, Cong; Wu, Chang; Zhang, Zhong-Dong; Deng, Tao; Meng J-X. Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection of GABA and its analogs in human serum with solid-phase extraction and fluorescein-based probes. *Anal Methods*. 2013;5(21):6000–8.
31. Tang Y Bin, Sun F, Teng L, Li W Bin, An SM, Zhang C, et al. Simultaneous determination of the repertoire of classical neurotransmitters released from embryonal carcinoma stem cells using online microdialysis coupled with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2014;849:70–9.
32. Casado M, Molero M, Sierra C, Garc A, Ormazabal A, Artuch R. Analysis of cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 2014;35:1181–7.
33. Wu J, Yu S, Wu S, Bao A. A sensitive and practical RP-HPLC-FLD for determination of the low neuroactive amino acid levels in body fluids and its application in depression. *Neurosci Lett*. 2016;616:32–7.
34. Clark BM, Schofield RS. Dilated cardiomyopathy and acute liver injury associated with combined use of ephedra, gamma-hydroxybutyrate, and anabolic steroids. *Pharmacotherapy*. 2005;25(5):756–61.
35. Bhattacharya I, Boje KMK. GHB (γ -Hydroxybutyrate) Carrier-Mediated Transport across the Blood-Brain Barrier. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311(1):92–8.
36. Caputo F, Vignoli T, Tarli C, Domenicali M, Zoli G, Bernardi M, et al. A brief up-date of the use of sodium oxybate for the treatment of alcohol use disorder. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(3):290.
37. Gallimberti L, Spella MR, Soncini C a, Gessa GL. Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol and heroin dependence. *Alcohol*. 2000;20(3):257–62.
38. Klein C, Mathis C, Leva G, Patte-Mensah C, Cassel JC, Maitre M, et al. γ -Hydroxybutyrate (Xyrem) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015;36(2):832–44.
39. Maitre M, Klein C, Mensah-Nyagan AG. A proposed preventive role for Gamma-hydroxybutyrate (Xyrem R) in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2016;8(1):37.
40. Rodgers J, Ashton CH. Liquid ecstasy: a new kid on the dance floor. *Br J Psychiatry*. 2004;184:104–6.
41. Ricaurte GA, McCann UD. Recognition and management of complications of new recreational drug use. *Lancet*. 2005;365(9477):2137–45.
42. Németh Z, Kun B, Demetrovics Z. The involvement of gamma-hydroxybutyrate in reported sexual assaults: a systematic review. *J Psychopharmacol*. 2010;24(9):1281–7.
43. Zhai D, Tan YQE, Xu W, Chang Y-T. Development of a fluorescent sensor for illicit date rape drug GHB. *Chem Commun*. 2014;50(22):2904–6.
44. Castro AL, Tarelho S, Dias M, Reis F, Teixeira HM. A fast and reliable method for GHB quantitation in whole blood by GC-MS/MS (TQD) for forensic purposes. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;119:139–44.
45. Castro AL, Dias M, Reis F, Teixeira HM. Gamma-hydroxybutyric acid endogenous production and post-mortem behaviour - The importance of different biological matrices, cut-off reference values, sample collection and storage conditions. *J Forensic Leg Med*. 2014;27:17–24.
46. Moriya F, Nishimura H, Furumiya J, Hashimoto Y. Effects of drinking and smoking on endogenous levels of urinary γ -hydroxybutyric acid, a preliminary study. *Leg Med*. 2006;8(4):231–4.
47. Petersen IN, Tortzen C, Kristensen JL, Pedersen DS, Breindahl T. Identification of a new metabolite of ghb: Gamma-hydroxybutyric acid glucuronide. *J Anal Toxicol*. 2013;37(5):291–7.
48. Hanisch S, Stachel N, Skopp G. A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid. *Int J Legal Med*. 2016;130(2):411–4.

49. Mehling L-M, Piper T, Dib J, Pedersen DS, Madea B, Hess C, et al. Development and validation of a HPLC-QTOF-MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine. *Forensic Toxicol.* 2016;35(1):77–85.
50. Kintz P, Cirimele V, Jamey C, Ludes B. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J Forensic Sci.* 2003;48(1):1–6.
51. Paul R, Tsanaclis L, Kingston R, Berry A, Guwy A. GC-MS-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in blood and urine. *J Anal Toxicol.* 2006;30(6):375–9.
52. Kaufmann E, Alt A. Determination of GHB in urine and serum by LC/MS using a simple one-step derivative. *Forensic Sci Int.* 2007;168(2):133–7.
53. Hasan L, Jermann TM, Weber JM, Abrahamsson L, Sc ME, Sciotti M, et al. An enzymatic method to determine γ -hydroxybutyric acid in serum and urine. *Ther drug.* 2011;33(6):757–65.
54. Meyer MR, Weber AA, Maurer HH. A validated GC-MS procedure for fast, simple, and cost-effective quantification of glycols and GHB in human plasma and their identification in urine and plasma developed for emergency toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(2):411–4.
55. Dahl SR, Olsen KM, Strand DH. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS. *J Chromatogr B.* 2012;885:37–42.
56. Grenier V, Huppé G, Lamarche M, Mireault P. Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices. *J Anal Toxicol.* 2012;36(7):523–8.
57. Zörntlein SW, Kopp A, Becker J, Kaufmann TJ, Röhrich J, Urban R. In vitro production of GHB in blood and serum samples under various storage conditions. *Forensic Sci Int.* 2012;214(1–3):113–7.
58. Ingels ASME, Neels H, Lambert WE, Stove CP. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biofluids using a one-step procedure with “in-vial” derivatization and headspace-trap gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2013;1296:84–92.
59. Busardò FP, Bertol E, Vaiano F, Baglio G, Montana A, Barbera N, et al. Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples. *Forensic Sci Int.* 2014;243:144–8.
60. Dziadosz M. γ -Hydroxybutyrate analysis in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry on the basis of MS3 mass transition. *J Chromatogr B.* 2015;986:8–11.
61. Tittarelli R, Pichini S, Pedersen DS, Pacifici R, Moresco M, Pizza F, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of GHB, GHB-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of narcoleptic patients under sodium oxybate treatment. *Forensic Sci Int.* 2017;274:70–4.
62. Andresen-Streichert H, Jensen P, Kietzerow J, Schrot M, Wilke N, Vettorazzi E, et al. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs. *Int J Legal Med.* 2014;129(1):57–68.
63. Mehling L, Piper T, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea B, et al. GHB-O- β -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake. *Forensic Toxicol.* 2017;1–12.
64. Ingels ASM, Wille SMR, Samyn N, Lambert WE, Stove CP. Screening and confirmation methods for GHB determination in biological fluids. *Forensic Toxicology.* *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(15):3553–77.
65. Sciotti MA, Hasan L, Scholer A, Jermann TM, Weber JM, Gyax D. Development and characterization of an enzymatic method for the rapid determination of gamma hydroxybutyric acid. *J Chem.* 2010;64(11):793–8.
66. Wood M, Laloup M, Samyn N, Morris MR, De Bruijn EA, Maes RA, et al. Simultaneous analysis of gamma-hydroxybutyric acid and its precursors in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2004;1056(1):83–90.
67. Richard D, Ling B, Authier N, Faict TW, Eschalié A, Coudoré F. GC/MS profiling of γ -hydroxybutyrate and precursors in various animal tissues using automatic solid-phase extraction. Preliminary investigations of its potential interest in postmortem interval determination. *Anal Chem.* 2005;77(5):1354–60.
68. Johansen SS, Windberg CN. Simultaneous Determination of γ -Hydroxybutyrate (GHB) and its Analogues (GBL , 1 . 4-BD , GVL) in whole blood and urine by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2011;35(1):8–14.
69. Petersen IN, Kristensen JL, Tortzen C, Breindahl T, Pedersen DS. Synthesis and stability study of a new major metabolite of γ -hydroxybutyric acid. *Beilstein J Org Chem.* 2013;9:641–6.
70. Wang X, Linnet K, Johansen SS. Development of a UPLC-MS/MS method for determining γ -

- hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. *Forensic Toxicol.* 2016;34(1):51–60.
71. Castro AL, Tarelho S, Dias M, Reis F, Teixeira HM. Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the post mortem interval. *Int J Legal Med.* 2016;130(4):959–65.
72. Donaldson AE, Lamont IL. Metabolomics of post-mortem blood: identifying potential markers of post-mortem interval. *Metabolomics.* 2014;11(1):237–45.
73. Korb AS, Cooper G. Endogenous concentrations of GHB in postmortem blood from deaths unrelated to GHB use. *J Anal Toxicol.* 2014;38(8):582–8.
74. Moriya F, Hashimoto Y. Site-dependent production of γ -hydroxybutyric acid in the early postmortem period. *Forensic Sci Int.* 2005;148(2):139–42.
75. Moriya F, Hashimoto Y. Endogenous γ -hydroxybutyric acid levels in postmortem blood. *Leg Med.* 2004;6(1):47–51.
76. Elliott S, Lowe P, Symonds A. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. *Forensic Sci Int.* 2004;139(2–3):183–90.
77. Lendoiro E, Cordeiro C, Rodríguez-Calvo MS, Vieira DN, Suárez-Peñaranda JM, López-Rivadulla M, et al. Applications of Tandem Mass Spectrometry (LC–MSMS) in estimating the post-mortem interval using the biochemistry of the vitreous humour. *Forensic Sci Int.* 2012;223(1):160–4.
78. Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic Sci Int.* 2015;254:158–66.
79. Rognum TO, Holmen S, Musse MA, Dahlberg PS, Stray-Pedersen A, Saugstad OD, et al. Estimation of time since death by vitreous humor hypoxanthine, potassium, and ambient temperature. *Forensic Sci Int.* 2016;262:160–5.
80. Hubig M, Muggenthaler H, Schenkl S, Mall G. Do multiple temperature measurements improve temperature-based death time estimation? The information degradation inequality. *Int J Legal Med.* 2016;130(5):1243–51.
81. Jansen EE, Vogel KR, Salomons GS, Pearl PL, Roulet J-B, Gibson KM. Correlation of blood biomarkers with age informs pathomechanisms in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD), a disorder of GABA metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39(6):795–800.
82. Malaspina P, Roulet JB, Pearl PL, Ainslie GR, Vogel KR, Gibson KM. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD): Pathophysiological complexity and multifactorial trait associations in a rare monogenic disorder of GABA metabolism. *Neurochem Int.* 2016;99:72–84.
83. Andresen H, Sprys N, Schmoldt A, Mueller A, Iwersen-Bergmann S. Gamma-Hydroxybutyrate in Urine and Serum: Additional Data Supporting Current Cut-Off Recommendations. *Forensic Sci Int.* 2010;200(1):93–9.
84. Cagnin A, Pompanin S, Manfioli V, Briani C, Zambon A, Saladini M, et al. γ -Hydroxybutyric acid-induced psychosis and seizures. *Epilepsy Behav.* 2011;21(2):203–5.
85. Gustavo González A, Ángeles Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2007;26(3):227–38.
86. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accredit Qual Assur J Qual Comp Reliab Chem Meas.* 2002;7(11):441–9.
87. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007;165(2–3):216–24.
88. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ. Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm Res.* 2000;17(12):1551–7.
89. Watson JT, Sparkman OD. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation. John Wiley & Sons; 2007.
90. McLafferty FW, Turecek F. Interpretation of mass spectra. 4th ed. University science books; 1993.
91. Diekman J, Thomson JB, Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CLV. Electron impact induced fragmentations and rearrangements of some trimethylsilyl ethers of aliphatic glycols, and related compounds. *J Org Chem.* 1968;33(6):2271–84.
92. Petersson G, Samuelson O, Anjou K, von Sydow E. Mass spectrometric identification of aldonolactones as trimethylsilyl derivatives. *Acta Chem Scand.* 1967;21(5):1251–6.
93. Petersson G. Mass spectrometry of hydroxy dicarboxylic acids as trimethylsilyl derivatives. Rearrangement fragmentations. *J Mass Spectrom.* 1972;6(5):565–76.
94. Li Q, Zhang G-F. Identification of n-hydroxy acid metabolites in electron impact ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26(11):1355–62.
95. Petersson G. Mass spectrometry of alditols as trimethylsilyl derivatives. *Tetrahedron.*

- 1969;25(18):4437–43.
96. Petersson G. Mass spectrometry of aldonic and deoxyaldonic acids as trimethylsilyl derivatives. *Tetrahedron*. 1970;26(13):3413–28.
97. Annan PM, Paul V. Trimethylsilyl group migration in the mass spectra of trimethylsilyl ethers of cholesterol oxidation products. Product ion characterization by linked-scan tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1993;4(4):327–35.
98. González RR, Fernández RF, Vidal JLM, Frenich AG, Pérez MLG. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. *J Neurosci Methods*. 2011;198(2):187–94.
99. Potapov AI, Vorontsov A V. Investigation of fragmentation pattern of bis(trimethylsilyl) ester of 3-mercaptopropionic acid. *Int J Mass Spectrom*. 2004;235(2):163–70.
100. Bergh MSS, Bogen IL, Lundanes E, Øiestad ÅML. Validated methods for determination of neurotransmitters and metabolites in rodent brain tissue and extracellular fluid by reversed phase UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr B*. 2016;1028:120–9.
101. International Organization for Standardization (ISO); ISO 8466-1: Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics (Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function). 1990.
102. Singtoroj T, Tarning J, Annerberg A, Ashton M, Bergqvist Y, White NJ, et al. A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41(1):219–27.
103. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B*. 2002;774(2):215–22.

5– Anexos

5- Anexos

Anexo A: Critérios de aceitação definidos no procedimento operacional para a validação de procedimentos de ensaio.

Tabela A1 – Critérios de aceitação definidos no SQTf-N para a cada um dos parâmetros avaliados para a validação de procedimentos de ensaio.

Parâmetro	Âmbito	Critério
Especificidade/ Seletividade e Capacidade de Identificação	Método qualitativo (rastreo)	Especificidade e Sensibilidade > 90% * Desvio Percentual > 30% *
	Método qualitativo (confirmação)	0% de falsos positivos 10% de falsos negativos
	Método quantitativo	CV < 20% Erro < 20% R > 1
Limiar de deteção	Método qualitativo e quantitativo	Adequado ao propósito do ensaio
Limite de quantificação	Método quantitativo	Adequado ao propósito do ensaio Calibração linear: CV < 20%
Gama de trabalho e Linearidade	Método quantitativo	Homocedasticidade das variâncias: $PG \leq F$ (IC 95%) Ajuste ao modelo linear: $PG \leq F$ (IC 95%) Intercepção = 0 (IC 95%) Normalidade: $r > 0,99$ (IC 95%)
Repetibilidade	Método quantitativo	CV < 10% (gama alta) CV < 20% (gama baixa)
Justeza	Método quantitativo	Resultado analítico \subset Intervalo de incerteza do MRC $ Z \leq 3$ $t_{exp} < t_{crit}$
Eficiência da extração	Método qualitativo e quantitativo	Adequado ao propósito do ensaio, de acordo com sensibilidade do método analítico
Arrastamento	Método qualitativo	Ver Especificidade/Seletividade
	Método quantitativo	20% do LQ 5% do padrão interno
Estabilidade		Variação de concentração nominal do analito: $\pm 20\%$
Diluição	Método quantitativo	CV < 10% (gama alta) CV < 20% (gama baixa)

* Para alguns grupos de compostos (e.g. anfetaminas) e tendo em consideração o tipo de amostras utilizadas em toxicologia forense, estes valores poderão ser superiores.

Anexo B: Dados obtidos no âmbito dos procedimentos da validação do método analítico para a quantificação de GHB-GLUC em amostras reais.

Tabela B1 – Resultados obtidos para curva de calibração realizada para a obtenção dos valores de LOD e de LOQ.

Concentração teórica (ng/mL)	Área		Razão Áreas
	GHB-GLUC	GHB-D6	
100	7534052	61646949	0,12
120	8137157	52778378	0,15
140	12786443	53360863	0,24
160	7188958	29840782	0,24
180	7857253	34299486	0,23
220	19316681	62771476	0,31
280	21846487	49933168	0,44
300	25392666	57193384	0,44

Tabela B2 – Dados obtidos para o cálculo do rendimento da extração do GHB-GLUC, no nível baixo (500 ng/mL) e no nível alto (5000 ng/mL).

Concentração (ng/mL)	Fortificação Prévia à Extração			Fortificação Posterior à Extração		
	Área		Razão Áreas	Área		Razão Áreas
Nível Baixo	GHB-GLUC	GHB-D6		GHB-GLUC	GHB-D6	
500	5866274	22018067	0,2664	9092768	14512578	0,6265
500	4818274	17539387	0,2747	12443138	17521935	0,7101
500	5535762	25173353	0,2199	11581605	18173516	0,6373
Nível Alto						
5000	97325589	34606428	2,8124	79794224	20097635	3,9703
5000	43092866	16386863	2,6297	90355054	23096986	3,9120
5000	47595899	20135136	2,3638	89555350	18885128	4,7421

Tabela B3 – Dados experimentais do estudo da precisão para o GHB-GLUC

Nível 1000 ng/mL					
GLUC	CQI1		Média	S	CV
1	1347,38	1353,68	1350,53	4,45	0,33
2	1931,37	1589,9	1760,64	241,46	13,71
3	904,36	1112	1008,18	146,82	14,56
4	1371,7	1338,93	1355,32	23,17	1,71
5	1412,65	1260,2	1336,43	107,80	8,07
6	1127,39	1202,32	1164,86	52,98	4,55
7	1813,93	1814,41	1814,17	0,34	0,02
8	1374,44	1571,85	1473,15	139,59	9,48
			1407,91	89,58	6,55
Nível 2500 ng/mL					
GLUC	CQI2		Média	S	CV
1	1353,68	1559,61	1456,65	145,61	10,00
2	2462,69	2303,25	2382,97	112,74	4,73
3	2239,03	2275,96	2257,50	26,11	1,16
4	2098,8	2397,24	2248,02	211,03	9,39
5	2252,08	2304,36	2278,22	36,97	1,62
6	3170,07	3104,86	3137,47	46,11	1,47
7	4399,3	3900,44	4149,87	352,75	8,50
8	2513,04	2688,85	2600,95	124,32	4,78
			2563,95	131,95	5,21
Nível 4000 ng/mL					
GLUC	CQI1		Média	S	CV
1	3757,82	3753,09	3755,46	3,34	0,09
2	5923,51	5552,78	5738,15	262,15	4,57
3	4700,39	4034,74	4367,57	470,69	10,78
4	3937,39	3839,89	3888,64	68,94	1,77
5	4761,97	4816,57	4789,27	38,61	0,81
6	5238,84	4948,91	5093,88	205,01	4,02
7	6866,75	7535,01	7200,88	472,53	6,56
8	3573,79	4142,57	3858,18	402,19	10,42
			4836,50	240,43	4,88

Tabela B4 – Dados obtidos no estudo da Precisão para o nível baixo (1000 ng/mL) de GHB-GLUC (Precisão intermédia, Repetibilidade e Limite de Repetibilidade).

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
1	2	2701,06	1350,53	19,845
2	2	3521,27	1760,635	58300,88
3	2	2016,36	1008,18	21557,185
4	2	2710,63	1355,315	536,93645
5	2	2672,85	1336,425	11620,501
6	2	2329,71	1164,855	2807,2524
7	2	3628,34	1814,17	0,1152
8	2	2946,29	1473,145	19485,354

ANOVA						
Fonte de variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	valor <i>P</i>	<i>F</i> crítico
Entre grupos	1047492,7	7	149641,81	10,471046	0,0017932	3,5004639
Dentro de grupos	114328,07	8	14291,009			
Total	1161820,7	15				

Repetibilidade (Sr)	119,54501
Precisão entre grupos (Srun)	260,14496
Precisão Intermédia (S1)	286,29776
Limite de Repetibilidade (%)	18,349087

Tabela B5 – Dados obtidos no estudo da Precisão para o nível médio (2500 ng/mL) de GHB-GLUC (Precisão intermédia, Repetibilidade e Limite de Repetibilidade).

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
1	2	2913,29	1456,645	21203,582
2	2	4765,94	2382,97	12710,557
3	2	4514,99	2257,495	681,91245
4	2	4496,04	2248,02	44533,217
5	2	4556,44	2278,22	1366,5992
6	2	6274,93	3137,465	2126,1721
7	2	8299,74	4149,87	124430,65
8	2	5201,89	2600,945	15454,578

ANOVA						
Fonte de variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	valor <i>P</i>	<i>F</i> crítico
Entre grupos	8759353	7	1251336,1	44,990392	8,40499E-06	3,5004639
Dentro de grupos	222507,27	8	27813,408			
Total	8981860,3	15				

Repetibilidade (Sr)	166,77352
Precisão entre grupos (Srun)	782,15176
Precisão Intermédia (S1)	799,73419
Limite de Repetibilidade (%)	14,57538

Tabela B6 – Dados obtidos no estudo da Precisão para o nível elevado (4000 ng/mL) de GHB-GLUC (Precisão intermédia, Repetibilidade e Limite de Repetibilidade).

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
1	2	7510,91	3755,455	11,18645
2	2	11476,29	5738,145	68720,366
3	2	8735,13	4367,565	221544,96
4	2	7777,28	3888,64	4753,125
5	2	9578,54	4789,27	1490,58
6	2	10187,75	5093,875	42029,702
7	2	14401,76	7200,88	223285,71
8	2	7716,36	3858,18	161755,34

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	19431672	7	2775953,1	30,690854	3,624E-05	3,5004639
Dentro de grupos	723590,98	8	90448,872			
Total	20155263	15				

Repetibilidade (Sr)	300,74719
Precisão entre grupos (Srun)	1158,7718
Precisão Intermédia (S1)	1197,1637
Limite de Repetibilidade (%)	13,658589